



# Comprendre et maîtriser les Biotechnologies au Sud

Les Cahiers de SudBiotech 2007-2017  
Cahier 2 - Expérimenter pour comprendre

Thierry Beulé - Yves Henry - Aimé Nato - Alain Rival





# Comprendre et maîtriser les Biotechnologies au Sud

Les Ateliers de SudBiotech : 2007-2017

Ressources pédagogiques et protocoles expérimentaux  
en Biotechnologie Végétale

Cahier 2

Expérimenter pour comprendre

*L'itinéraire pédagogique ou La pratique de la pratique*

Thierry BEULE • Yves HENRY • Aimé NATO • Alain RIVAL

Sous l'amical parrainage de Michel DRON, Professeur Emérite à l'Université Paris-Saclay

### CAHIER 2

#### Expérimenter pour comprendre

#### *L'itinéraire pédagogique ou La pratique de la pratique*

|  |    |
|--|----|
| TP1 : Programmation Morphogénétique d'une plante Supérieure. Apports des modèles de cultures in vitro dans l'illustration de la totipotence de la cellule végétale et rôle des signaux de développement (lumière et régulateurs de croissance) | 2  |
| TP2 : Marqueurs Physiologiques et Biochimiques caractéristiques de la Prolifération (mitoses actives) et de la Différenciation Photosynthétique de la cellule végétale. Exemple des 2 carboxylases végétales (PEPCase et RuBisCO)              | 7  |
| TP3 : La Flexibilité métabolique : La régulation des carboxylases végétales. Apports du mutant albina de tabac (Nicotiana tabacum var Xanthi).   | 7  |
| TP4 : La Germination : Rôle du signal d'imbibition chez différentes semences végétales dans la levée de dormance. Analyse et caractérisation biochimique de différentes séquences du développement de la plante.                               | 23 |
| TP5 : La plasticité génomique : Apport de la PCR (Polymerase Chain Reaction) dans l'étude de l'expression des gènes  | 32 |
| TP6 : L'expression génique : Etude de l'expression de l'alpha-amylase et de la RuBisCO durant la germination du Riz  | 47 |

## TP1 : Programmation Morphogénétique d'une plante Supérieure. Apports des modèles de cultures *in vitro* dans la définition de la Totipotence de la Cellule Végétale et importance des Signaux de développement (Hormones - Lumière)

---

### Démarche pédagogique

Il s'agit ici de proposer aux étudiants sous forme d'observations, d'expérimentations et de démonstrations, une analyse des différentes facettes ou stratégies de la construction d'une plante supérieure et leur exploitation en biotechnologie *via* la culture *in vitro*.

### Mots-clés

Cellules souches et méristèmes- totipotence de la cellule végétale- prolifération- différenciation - équilibre hormonal - signaux de développement- Culture *in vitro* et biotechnologie végétale.

### Fondamentaux

La totipotence des cellules végétales traduit leur aptitude - en quelque sorte - à effacer leur spécialité *via* la culture *in vitro*. Ce processus paraît moins aisé avec les cellules animales. Cette forte capacité de la plupart des cellules végétales à redonner des cellules souches totipotentes est un élément notable des différences entre plantes et animaux. Ainsi, même sur un espace limité, certains types cellulaires et ou organes isolés se comportent comme des cellules méristématiques.

En outre, l'importance des communications intercellulaires, nécessaires au maintien d'une structure méristématique organisée, a été mise en évidence. Ces réseaux fonctionnels, relayés par différents signaux, doivent interagir avec les mécanismes impliqués dans la morphogenèse cellulaire, comme le montrent la modulation spatiale et temporelle fine de la prolifération et de l'expansion des cellules observée par l'analyse histologique classique du méristème et des primordias foliaires.

Cette question des conséquences du fonctionnement cellulaire sur le développement de l'organisme est au centre des recherches actuelles, qui visent à comprendre comment le méristème apical réalise l'état d'équilibre dynamique.

Les hormones végétales, plus rigoureusement appelées phytohormones ou régulateurs de croissance ont souvent comme fonction d'assurer la croissance de la plante et ou sa morphogenèse.

C'est le cas notamment de l'auxine qui contribue à la formation des organes de la plante (les racines par exemple) et à sa croissance mais intervient aussi dans les phénomènes de tropisme. Elles ont des propriétés activatrices de la division cellulaire, mais elles sont également impliquées dans la croissance et la différenciation cellulaire, entre autres.



En ce qui concerne les cytokinines, elles ont des propriétés activatrices de la division cellulaire, mais elles sont également impliquées dans la croissance et la différenciation cellulaire, entre autres.

### Observer et comprendre

Qu'apporte un modèle *in vitro* dans la compréhension de la programmation morphogénétique ?

Observer et décrire les situations illustrées par les cultures de Tabac.

Cultures aseptiques sur milieu gélosé (8g/l) de Murashige et Skoog dans une salle conditionnée (25 °C- photopériode 16h/8-humidité 70 %)

**Nature des Explants :** Tige avec ou sans bourgeon axillaire- Feuille sans pétiole - Racines isolées, colonies cellulaires(Cals) organogènes ou non.

**Boîtes T ou Témoin:** Milieu sans hormones

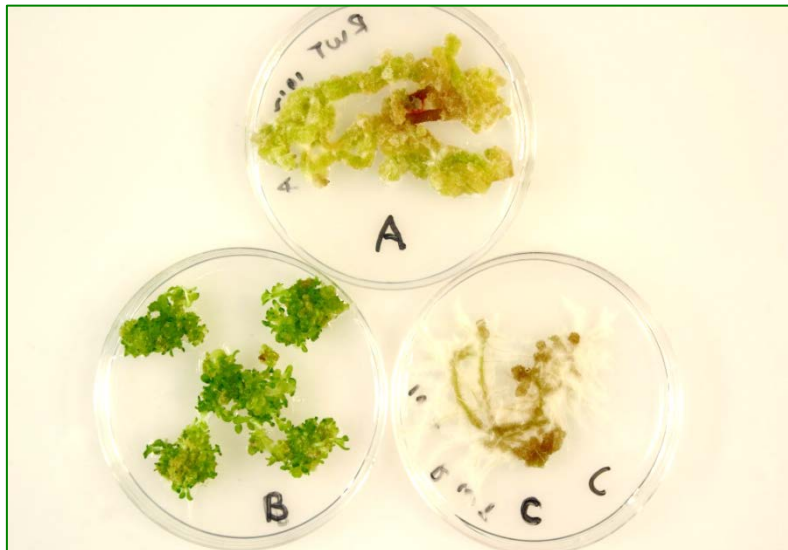
**Boîtes A** ou Milieu riche en auxine : rapport AUX/ CK : 2mg/ 0.2 mg par litre Lumière et Obscurité

**Boîtes B** ou Milieu riche en cytokinine : rapport AUX/ CK : 0.2mg/ 2 mg par litre Lumière et Obscurité

**Boîtes C** ou Milieu avec une faible dose en Auxine 0.02 mg par litre

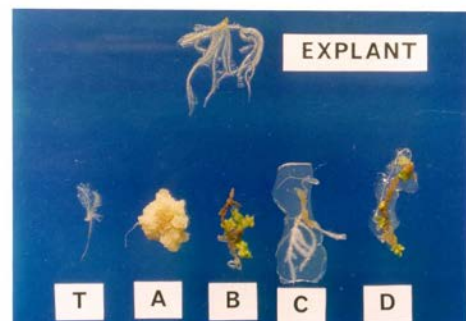
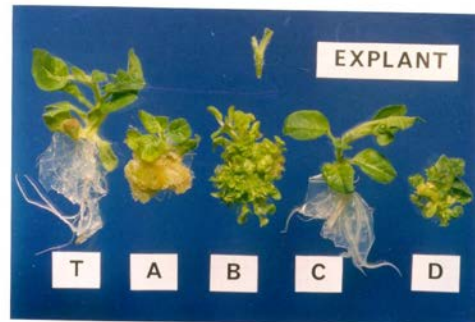
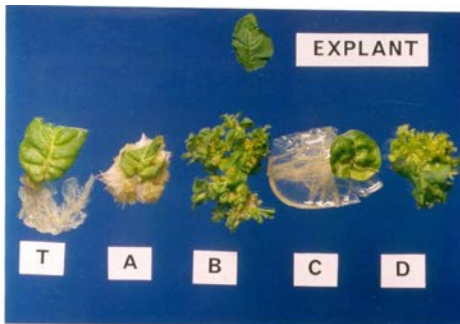
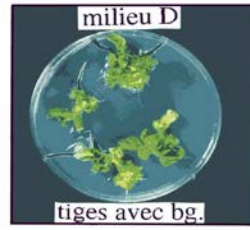
**Boîtes D** ou Milieu avec une faible dose en Cytokinine 0.02 mg par litre

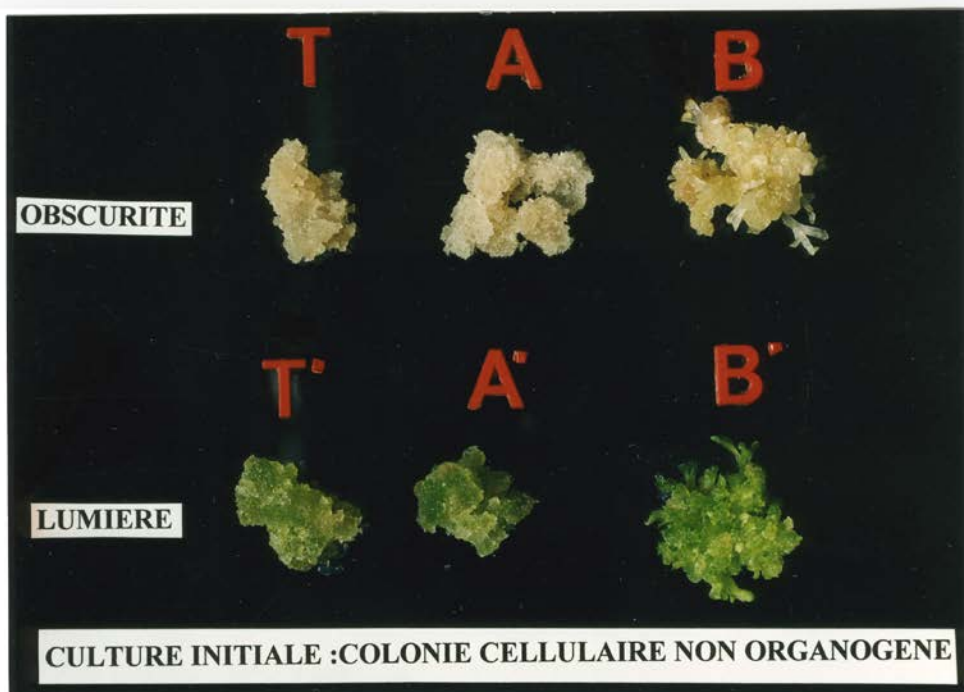
Vitroplants de Tabac vert et Albina cultivés sur milieu C et à la lumière ou l'obscurité

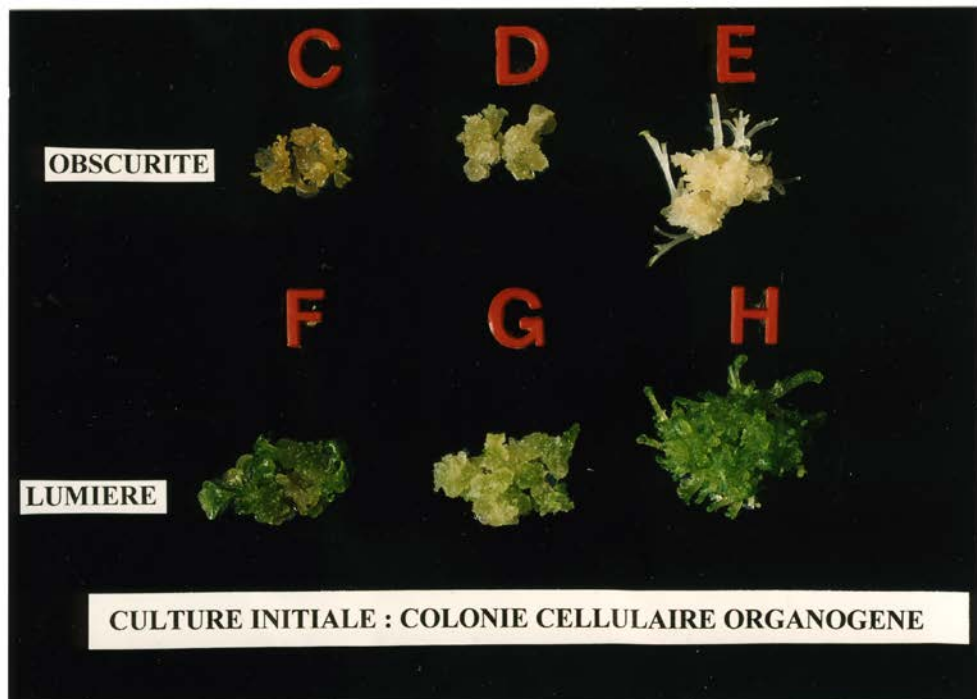


Exemple de programmation morphogénétique obtenu *in vitro* à partir de racines isolées de tabac mises en culture - A : Milieu riche en auxine, B : Milieu riche en cytokinine, C : Milieu faiblement enrichi en auxine

## Hormonologie Végétale









TP 2 : Recherche des Marqueurs Physiologiques et Biochimiques caractéristiques de la Prolifération (mitoses actives) et de la Différenciation Photosynthétique de la cellule végétale. Exemple des 2 carboxylases végétales (PEPCase et RuBisCO)

---

TP 3 : La Flexibilité métabolique : La régulation des carboxylases végétales. Apports du mutant albina de tabac (*Nicotiana tabacum* var *Xanthi*).

---

|  |
|--|
| <p><b>Note préliminaire :</b> Ces deux Travaux pratiques partagent les mêmes démarches expérimentales et font appel aux mêmes techniques. Les deux séances sont menées conjointement et leurs résultats exploités simultanément.</p> |
|--|

### Démarche pédagogique

Il s'agit ici de poursuivre l'itinéraire pédagogique en montrant comment, sous des conditions contrôlées, la plante est capable de réorienter son métabolisme en réponse à des stimuli externes. Nous avons choisi ici la lumière et les régulateurs de croissance. Nous allons mettre en évidence cette flexibilité métabolique grâce à l'étude d'un mutant albina de tabac (*Nicotiana tabacum* var *Xanthi*).

L'activité métabolique choisie est la photosynthèse et nous allons nous intéresser spécifiquement à deux carboxylases végétales pour illustrer les réorientations métaboliques provoquées par des changements d'environnement de la cellule végétale.

### Mots-clés

Flexibilité métabolique, protéome, carboxylases végétales, photosynthèse, physiologie du développement, Western Blot, Immunoempreintes, Double immunodiffusion, Test d'Ouchterlony

### Fondamentaux

La physiologie du développement, abordée sous l'aspect de lecture biochimique, reste un vaste domaine, parfois difficile à cerner quand on s'adresse aux Plantes Supérieures. En l'état actuel des connaissances, il n'est pas facile de dresser des schémas généraux d'intégration des divers acteurs et des paramètres de fonctionnement et de proposer des conclusions de portée générale.

**Les signaux de développement :** Plusieurs étapes du développement des plantes, la vie ralentie, la levée des dormances, la germination et les phases de la croissance végétative et de la différenciation florale sont des phénomènes d'un niveau de complexité élevé et intègrent un ensemble d'événements successifs conduisant de la perception primaire des signaux à l'expression des modifications du fonctionnement des gènes finalement avec des conséquences sur l'expression de la morphogenèse.

**La lumière,** sous sa forme de particules d'énergie ou photons, et selon sa longueur d'onde, sa durée, son intensité et sa direction, reste un puissant signal d'environnement pour les Plantes non seulement comme carburant de la Photosynthèse, mais comme acteur principal des aspects de la vie des plantes connus sous le nom de Photomorphogenèse.

Si on sait très peu de choses sur la voie de la transduction et les molécules relais ou messagers secondaires impliqués dans le système de régulation génétique, on assiste à des avancées spectaculaires sur les photorécepteurs chez les Plantes.

Le photorécepteur ou phytochrome est un pigment bleu-vert qui existe sous deux formes interchangeableables : l'une Pr absorbe la lumière rouge de longueur d'onde voisine de 660 nm et l'autre P<sub>rl</sub> absorbe le rouge lointain à 730 nm.

Le phytochrome est un commutateur biologique : lorsqu'un des deux pigments reçoit de la lumière de longueur d'onde appropriée, il se transforme en l'autre forme : le rouge lointain convertit le P<sub>rl</sub> en Pr, et la lumière rouge transforme le Pr en P<sub>rl</sub>. Ce dernier est la forme de phytochrome actif, à partir de laquelle s'effectuent les réactions photomorphogénétiques. De ce fait, la lumière rouge active certains gènes régulant le développement.

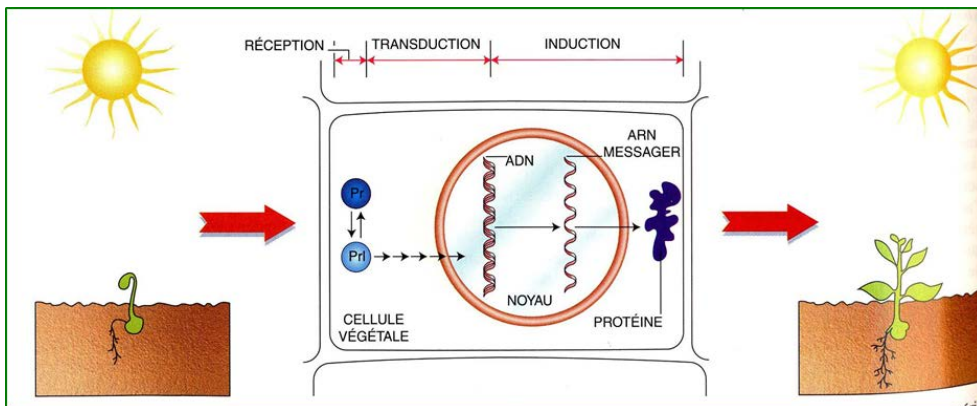
Il faut aussi souligner que des familles de phytochromes existent et que d'autres photorécepteurs, responsables de l'absorption des rayonnements bleus et ultra-violet ont été décrits chez les plantes.

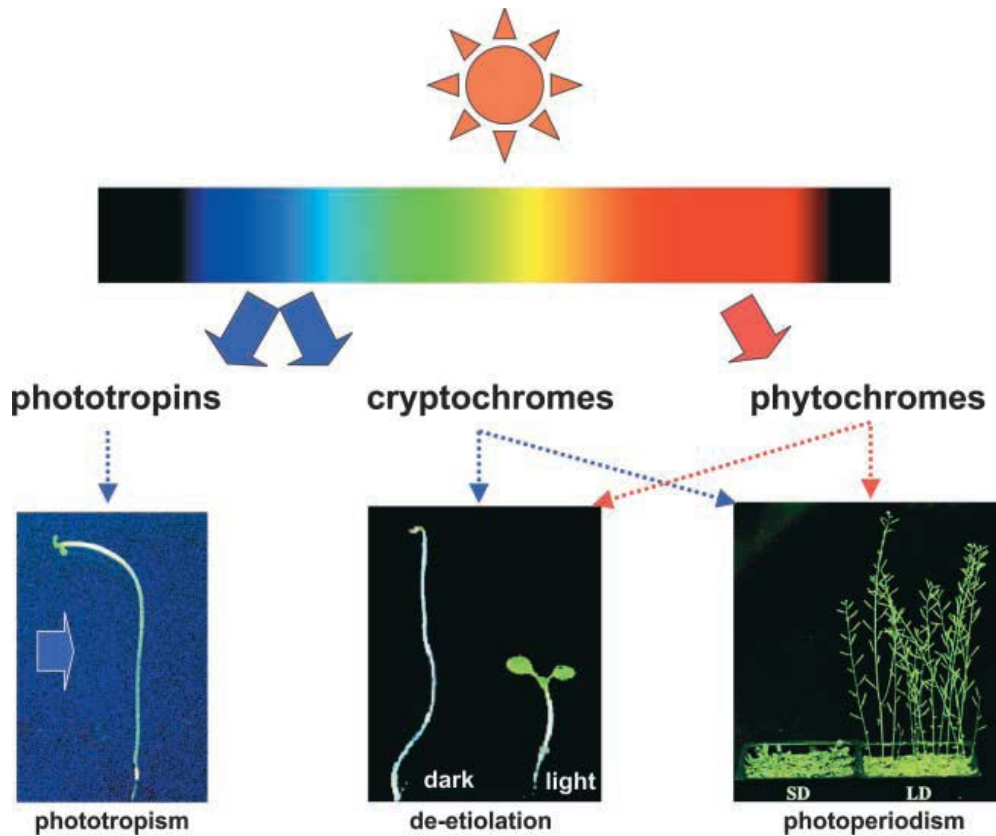
La Photomorphogenèse s'effectue en trois étapes : d'abord des pigments ou phytochromes captent la lumière, puis le signal lumineux passe des pigments aux gènes (transduction) et, enfin les gènes commandent le développement (réponses biologiques).



La qualité de la lumière est perçue par les Phytochromes qui absorbent la lumière rouge et rouge-lointain existent chez les plantes, les algues et les bactéries. Les Cryptochromes perçoivent la lumière bleue.

Le photorécepteur le plus connu ou phytochrome est un pigment bleu-vert qui existe sous deux formes interchangeables : l'une Pr absorbe la lumière rouge de longueur d'onde voisine de 660 nm et l'autre PrI absorbe le rouge lointain à 730 nm.





Functions of Blue Light Receptors in Phototropism, Photomorphogenesis, and Photoperiodic Flowering. Solid arrows depict light, and dashed arrows depict signal transduction of photoreceptors. (Blue Light Receptors and Signal Transduction by Chentao Lin in: The Plant Cell, S207–S225, Supplement 2002, [www.plantcell.org](http://www.plantcell.org) © 2002 American Society of Plant Biologists)

Il faut aussi souligner que des familles de phytochromes existent et que d'autres photorécepteurs, responsables de l'absorption des rayonnements bleus et ultra- violets ont été décrits chez les plantes.



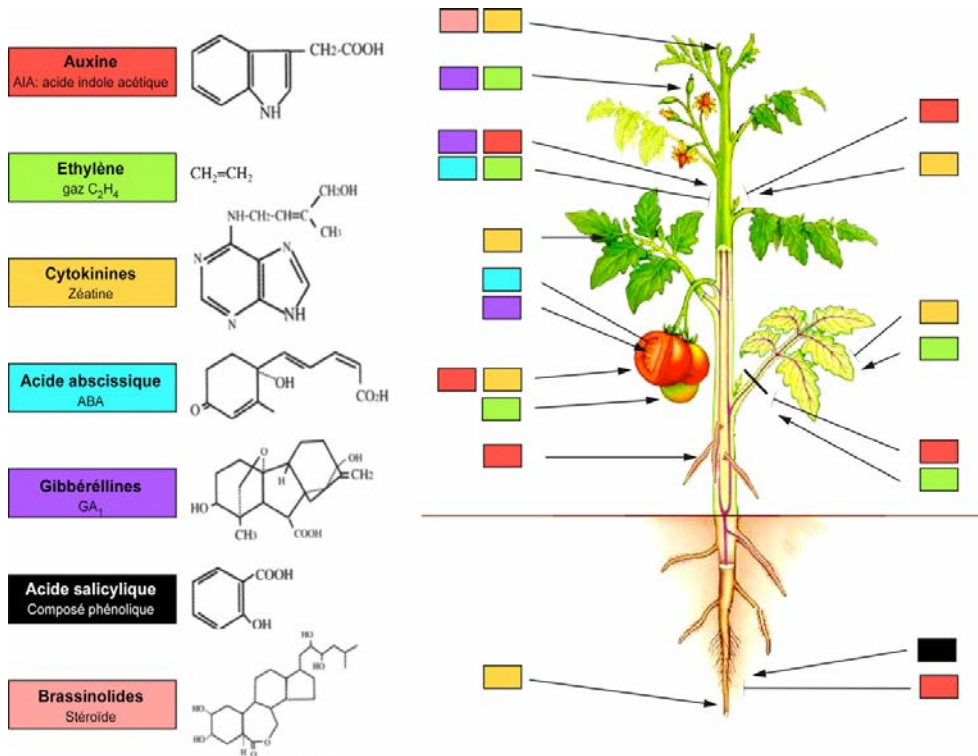


Semis normaux et étiolés : rôle de la lumière sur la croissance et le développement

**Les régulateurs de croissance** (Hormones ou Phytohormones) sont des signaux internes, vecteurs des informations morphogénétiques, impliqués dans les problèmes de l'édification du végétal et contrôlent donc les importantes étapes du développement de la plante, en particulier les processus de la prolifération (mitose) et de la différenciation.

Les techniques de la culture in vitro des tissus et des cellules végétales ont permis l'étude des phénomènes d'organogenèse (callogenèse, caulogenèse, rhizogenèse) et d'embryogenèse somatique (induction des deux structures méristématiques, permettant la régénération d'une plante normalement constituée sans la phase reproductive).

Des nombreuses applications biotechnologiques (multiplication végétative, clonage, hybridation somatique et transgénèse végétale) découlent du dogme de la totipotence de la cellule végétale. Cependant, ces étapes de développement correspondent à des changements successifs de structures et de fonctions et la croissance, la différenciation cellulaire et la morphogenèse sont des processus grâce auxquels aussi bien la cellule somatique végétale ou le zygote se transforme en organisme pluricellulaire.



Les travaux sont aujourd'hui orientés vers la recherche des conditions d'expression des différents processus de la croissance tels que la prolifération et la différenciation.

L'approche physiologique consiste aussi à rechercher, à caractériser et/ou à moduler l'expression des marqueurs enzymatiques et des éléments protéiques impliqués dans des voies de signalisation. Cet aspect concerne l'analyse des supports moléculaires de la perception, de la transduction et de la régulation des signaux de développement tels que la lumière et la balance hormonale.

Dans le cadre de notre travail, les études proposées portent sur l'expression du métabolisme carboné par l'analyse des deux enzymes clés de fixation de CO<sub>2</sub> (PEPCase, RuBisCO).

Notre hypothèse de travail repose sur le fait que la division cellulaire est consommatrice de source carbonée, fournie sous forme de saccharose dans les conditions de culture *in vitro*. Cette caractéristique physiologique, considérée comme une étape dite de dépendance hétérotrophique ou mixotrophe peut être suivie par le biais de l'expression de la PEPC.

La différenciation cellulaire, en particulier du méristème caulinaire, responsable de l'organogenèse foliaire peut être suivie par l'acquisition progressive de la capacité autotrophique des structures photosynthétiques et donc par le biais de l'expression de la RuBisCO. Une autre raison du choix de cette protéine chloroplastique réside sur le fait que la division cellulaire active peut être un événement antagoniste avec la vitesse de division et de maturation chloroplastique.

La PEPCase (EC 4.1.1.31), largement distribuée dans les cellules et les tissus végétaux joue un rôle majeur dans le métabolisme des plantes. De tous ses rôles physiologiques, le plus important est celui qu'elle catalyse chez les plantes de type métabolique C<sub>4</sub> et chez les CAM.

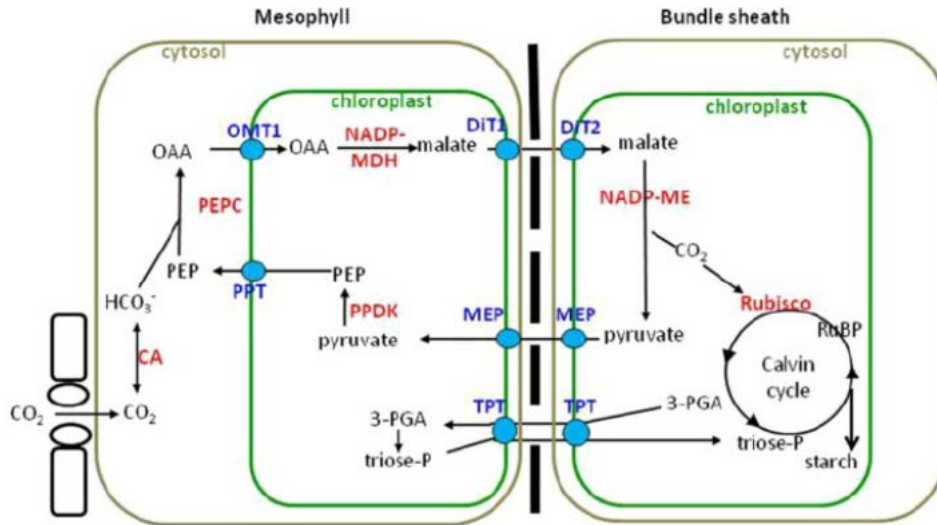
La PEPCase catalyse la réaction irréversible de bêta- carboxylase du PEP en oxaloacétate. Cette réaction exergonique requiert comme cofacteur la présence de Mg<sup>2+</sup>. Sur le plan structural, la protéine native constituée de 4 sous unités identiques a un poids moléculaire proche de 400 kDa. La PEPC est soumise à plusieurs niveaux de régulation : contrôle transcriptionnel avec l'effet de la lumière de croissance, régulation métabolique par les produits de la photosynthèse (glucose 6 P et L-malate), enfin régulation post-traductionnelle avec un mécanisme covalent par phosphorylation qui modifie les propriétés fonctionnelles de l'enzyme.

La Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO, EC 4.1.1.39) intervient lors de la première étape du cycle des pentoses phosphates par la fixation du CO<sub>2</sub> sur une molécule de ribulose diphosphate, un sucre en C<sub>5</sub>. Cette carboxylase joue un rôle primordial dans la régulation de l'activité autotrophique des plantes. Très abondante, la RuBISCO peut représenter jusqu'à 30-50 % des protéines solubles totales des feuilles. L'enzyme est localisée dans le stroma des chloroplastes.

Sur le plan structural, cette carboxylase est constituée de deux types de sous unités : la grande sous -unité ou GSU, de poids moléculaire d'environ 55 Da et de la petite sous unité ou PSU d'environ 15 Da. L'association de huit polypeptides de chaque sorte pour former la protéine native confère à l'enzyme un PM de l'ordre de 550 kDa. La biosynthèse des deux sous-unités est sous contrôle des génomes chloroplastiques (pour la GSU) et nucléaire (pour la PSU).

De plus, la lumière de croissance joue un rôle crucial, dans l'activation de ces gènes. Le fonctionnement de la RuBisCO est sous la dépendance de nombreux facteurs de régulation tels que le CO<sub>2</sub>, le Mg<sup>2+</sup>, des métabolites du cycle de Calvin, de la RuBisCO activase, de la lumière...

L'approche physiologique consiste à rechercher, à caractériser et/ou à moduler l'expression des marqueurs enzymatiques et des éléments protéiques impliqués dans des voies de signalisation. Cet aspect concerne l'analyse des supports moléculaires de la perception, de la transduction et de la régulation des signaux de développement tels que la lumière et la balance hormonale.



## Objectifs

Il s'agit ici d'analyser les éléments marqueurs choisis et concernant les voies métaboliques, susceptibles de caractériser des processus de mitoses actives (prolifération) et de la différenciation morphogénétiques.

On disposera d'un lot de matériel biologique composé de cultures cellulaires sous forme de cals organogènes ou non, systèmes d'organes tels que les feuilles, tiges et racines isolées de vitroplants de tabac et mises en culture *in vitro* à la lumière ou à l'obscurité, avec un équilibre hormonal variable en auxine /cytokinine.

Après avoir extrait la totalité des protéines solubles des différents lots, notre étude se focalisera sur les niveaux d'expression des enzymes de carboxylation (PEPCase et RuBisCO) qui jouent un rôle primordial dans la définition métabolique des deux processus qui nous intéressent (prolifération et/ ou différenciation).

- On se propose au cours de cette étude d'analyser les relations entre la vitesse de la division cellulaire induite par l'équilibre hormonal et la mise en place des structures chloroplastiques sous contrôle du signal lumineux.
- On s'intéressera à la régulation métabolique et répondre aux questions de modulations des activités enzymatiques par des processus d'activation et/ou de synthèse préférentielle des molécules protéiques.
- On pourra aussi analyser l'impact du signal lumineux dans la biosynthèse coordonnée ou non des deux sous- unités de la RuBisCO par exemple.



La maîtrise de ces différentes techniques d'électrophorèse et de l'Immunoempreinte nous permettra de nous intéresser aux liens entre transformations morphologiques, cytologiques et métaboliques (données physiologiques ou biochimiques) induites par le signal lumineux et ou l'impact de l'équilibre hormonal.

Sur les différents matériels disponibles lors de la séance, il est ainsi proposé de :

- faire des observations et une analyse comparative du point de vue morphologique et cytologique,
- extraire et de quantifier les teneurs en protéines solubles totales des différents lots,
- réaliser une séparation électrophorétique des protéines enzymatiques et de localiser sur gel de polyacrylamide en conditions natives l'activité et les isoformes de la PEPCase,
- faire une analyse électrophorétique en conditions dénaturantes (SDS) du contenu protéique et un transfert de ces protéines sur membranes Immobilon (Millipore),
- caractériser les protéines choisies telles que la PEPCase et la RuBisCO, grâce à la technique d'immunoempreintes (Western Blots) avec l'apport des anticorps polyclonaux.
- réaliser des tests de double diffusion dite de Ouchterlony pour la caractérisation rapide des 2 carboxylases analysées (PEPCase et RuBisCO).

## Méthodes expérimentales

### EXTRACTION DES PROTEINES SOLUBLES

Le matériel pesé (1 à 2 g) de masse fraîche, coupé en petits fragments est broyé dans un mortier refroidi avec un volume de 1 à 2 ml de solution tampon (Tris-HCl pH 8, Mg Cl<sub>2</sub> 10mM, PMSF 0,5 mM et DTT 5 mM).

Le broyat est filtré sur toile de Nylon (blutex de 36 µm de maille). Cette opération se déroule à 4°C pour éviter la dégradation des protéines enzymatiques lors de leur libération dans le tampon.

Le filtrat est transvasé dans un tube Eppendorf et centrifugé à 4 °C à 10000 tours / min pendant 10 minutes.

Le surnageant récupéré contient les protéines solubles. On mesure le volume exact de l'extrait obtenu après centrifugation. On conserve soigneusement l'extrait à 4 °C jusqu'au moment de l'utilisation.

## **DOSAGE QUANTITATIF DES PROTEINES SOLUBLES**

Le principe d'un micro-dosage colorimétrique, simple, rapide et reproductible selon la méthode décrite par Sedmak et Grossberg (Analytical Biochemistry 1977, 79 : 544-552) est appliqué.

La méthode utilise la fixation du bleu de Coomassie, sous sa forme anionique, sur les protéines grâce à des interactions électrostatiques avec leurs groupements cationiques. La fixation du bleu de Coomassie (apparition d'une coloration bleue, mesurée à 610 nm) se réalise grâce à la présence dans la molécule à évaluer des groupements fonctionnels basiques et/ou aromatiques.

La sensibilité de la méthode permet des dosages de 0,5 à 50 µg de protéines présentes dans les extraits bruts, d'autant plus que les interférences avec les acides aminés libres sont négligeables.

A partir d'une solution de SAB à 1 µg/ µl, on établira une courbe-étalon, qui servira pour la quantification des protéines présentes dans les différents extraits.

Faire une dilution au 1/10 des extraits de chaque lot (100 µl + 900 µl de tampon) et préparer les dosages (prises de 25, 50, 100, 200 µl de l'extrait dilué) dans des tubes en plastique de 5 ml et transvaser dans des cuves spectro plastique de 3ml.

Compléter à 1 ml avec une solution mélange de l'eau + glycérol. Ajouter 1 ml du réactif de Sedmak (0,12 % de bleu de Coomassie G250 dissous dans 3% de PCA). Agiter et attendre 5 mn avant de mesurer à 610 nm.

Se servir de la gamme-étalon (entre 0 et 50 µg de SAB) réalisée dans les mêmes conditions pour déterminer la teneur des protéines des différents échantillons.

## **SEPARATION ELECTROPHORETIQUE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE DES PROTEINES SOLUBLES.**

L'électrophorèse est une méthode rapide de séparation et d'analyse des protéines basée sur la migration différentielle des particules chargées sous l'influence d'un champ électrique.

Au cours de l'électrophorèse, les protéines porteuses de charges électriques sont placées en milieu aqueux en présence d'électrolytes dilués et migrent à l'intérieur d'une phase solide.

Dans la technique d'électrophorèse PAGE, on polymérise des monomères d'acrylamide avec un agent pontant, le méthylène bis acrylamide créant une réticulation. La porosité est contrôlée en jouant sur les proportions de monomères d'acrylamide et d'agents pontants. Le gel intervient dans le processus séparatif comme tamis moléculaire.

L'électrophorèse en condition native concerne les protéines gardant leur structure, leur fonctionnalité et leur charge propre et dont la migration se fera en fonction de cette charge, de leur masse et de leur encombrement. Cette technique qui permet de repérer la bande protéique sur le gel par son activité peut être utilisée comme une étape de purification de la molécule. Les électrophorèses sont effectuées sur des mini-gels en plaque coulés verticalement.

Les gels sont coulés entre deux plaques de verre espacées de quelques millimètres (0,75 à 1,5 mm) formant un volume étanche. Dans la partie supérieure (gel de stacking ou de concentration), on dispose un peigne avec des puits où seront déposés les échantillons

et dans la partie inférieure (gel de résolution), les protéines seront séparées. La concentration en acrylamide est très faible dans le stacking (3 %) afin que les protéines se concentrent en une fine bande en arrivant à la frontière avec le gel résolutif plus concentré (6%).

Le gel résolutif est coulé en premier sur 6 à 7 cm de longueur, on ajoute du butanol pour lisser la surface. Après la polymérisation, on retire le butanol, on rince la surface à l'eau distillée. On peut alors couler le gel de stacking dans lequel on pratique des puits à l'aide d'un peigne avant qu'il ne polymérise.

La solution tampon qui est utilisée pendant l'électrophorèse a la composition suivante : Glycine 192 mM- Tris 25 mM pH 8,3.

En fin de migration (sortie du bleu de bromophénol du gel, utilisé comme témoin de migration), les différentes protéines sont localisées sur le gel soit par coloration, soit par leur activité biologique, s'il s'agit d'enzymes susceptibles de transformer un substrat en produit coloré.

### **Application Pratique :**

Nous allons révéler la PEPCase grâce à la coloration de l'Oxaloacétate ou OAA (produit de la réaction BIC + PEP, catalysée par cette enzyme) en rouge vif par le Fast Violet Blue (produit Sigma).

Dans chaque puit, 50 à 100 µl d'extrait (30 à 60 µg) de protéines solubles sont déposés. Avant le dépôt, on ajoute aux extraits des cristaux de saccharose et quelques gouttes de solution saturée de bleu de bromophénol.

L'électrophorèse est conduite à 4 °C sous 100 volts pendant 2 heures, avec une solution tampon d'électrophorèse (Glycine 192 mM- Tris 25 mM pH 8,3 ).

A la fin de l'électrophorèse, on démoule les gels, on les transfère dans une boîte de Petri et on les incube à 30 °C pendant 20 min dans une solution tampon Tris-HCl 0,1 M pH8 renfermant du NaHCO<sub>3</sub> 40 mM+ MgCl<sub>2</sub> 20 mM+ PEP 10 mM. On prévoit un gel témoin incubé seulement dans la solution tampon.

Pour la révélation, verser dans chaque boîte de Petri ,10 mg du colorant Fast Violet Bleu. La bande rouge brique qui apparaît révèle la localisation de la PEPC sur le gel.

Quant à la RuBisCO, à défaut de sa localisation par son activité, une coloration légère au rouge Ponceau permet de la focaliser facilement grâce à sa très grande quantité dans les extraits surtout foliaires.

Dans la technique PAGE-SDS, la migration est faite en présence du détergent ionique SDS (dodécyle sulfate de sodium). L'association par des liaisons hydrophobes des molécules de SDS aux protéines a deux effets :

- elle détruit leur structure tertiaire et quaternaire si celle-ci ne fait pas intervenir de liaisons covalentes établies par des ponts disulfure. Dans le cas contraire, il est possible de dissocier les polypeptides assemblés en structure quaternaire par le mércaptoéthanol, agent réducteur qui coupe les ponts disulfure.

- elle confère aux différentes protéines une charge égale et négative et se comportent donc comme des anions. Les protéines ou les polypeptides seront alors séparés par effet de filtration en fonction de leur masse moléculaire.

Il existe une relation linéaire entre le logarithme de la masse moléculaire et le déplacement électrophorétique des polypeptides au sein du gel. Cette technique est utilisée pour déterminer la masse moléculaire apparente d'une protéine par référence à des marqueurs protéiques séparés dans les mêmes conditions mais dont on connaît les poids moléculaires.

### **Application Pratique :**

Les électrophorèses sont effectuées sur des mini-gels en plaque coulés verticalement. Entre les 2 plaques de verre accolées l'une à l'autre et fixées sur un support, on coule le gel résolutif de polyacrylamide (15 % avec une solution Tampon 375 mM Tris pH 8,8 et SDS 1%), puis on lisse la surface avec 200 µl de butanol. Après la polymérisation, on se débarrasse du solvant et sur une surface bien sèche, on coule un gel de stacking ou de concentration à 5 % de polyacrylamide dans une solution de 0,1 M Tris-HCl pH 6,8 et 0,1% de SDS et on s'arrange pour introduire dans ce gel un peigne qui donnera la forme des puits de dépôt.

Les extraits protéiques sont traités avec un milieu de dénaturation 0,1M Tris-HCL pH6,8, 2 % SDS +20 % Glycérol+5 % β-Mercaptoéthanol et 1 % de bleu de bromophénol de façon à obtenir une préparation du mélange final à 10 à 30 µg de protéines solubles totales dissoutes dans 1ml. La dénaturation finale est obtenue par chauffage des extraits dans un bain-marie bouillant pendant 3 minutes.

Pour la révélation de la RuBiSCO par immuno-empreinte, une dilution supplémentaire sera nécessaire afin de déposer seulement 0,5 à 1 µg de protéines solubles dénaturées dans chaque puit.

L'électrophorèse se déroule à la température ambiante (20 °C) dans une solution tampon de 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0,1 % de SDS, pH8, 3 sous 100 Volts durant 2 à 3 heures. En plaçant dans un puits, 5 à 10 µl d'un mélange de marqueurs protéiques colorés de masse moléculaire connue, on pourra déduire la masse moléculaire des protéines ou des polypeptides recherchés.

En fin d'électrophorèse, les polypeptides séparés peuvent être localisés sur le gel par la coloration (40% Ethanol +10% Acide Acétique +0,2 % Bleu de Coomassie G-250).

Mais on peut aussi envisager une caractérisation spécifique par immunodétection, car les molécules dénaturées par le SDS ont perdu leur activité biologique mais elles ont pu conserver une certaine activité antigénique.

### **TECHNIQUE DE TRANSFERT (Western Blot) DES PROTEINES SUR MEMBRANE DE NITROCELLULOSE OU IMMOBILON**

Le transfert d'une protéine sur un support solide permet de détecter et de caractériser rapidement et efficacement cette molécule grâce à l'apport de l'outil immunochimique. On cherche donc à obtenir une empreinte des protéines totales après séparation en



PAGE-SDS. La protéine ou des polypeptides constitutifs peuvent être marqués par un anticorps spécifique. Ce marquage est ensuite amplifié puis révélé par une réaction enzymatique.

Le transfert des protéines du gel de polyacrilamide se fait sur une membrane de type nitrocellulose ou de poly fluorine de vinyle (PVDF) Immobilon-P. Celle-ci peut retenir les petits polypeptides de PM inférieurs à 10000 daltons.

### **Application Pratique :**

On commence par retirer soigneusement le gel pour le placer dans un bain de solution tampon de transfert (Glycine 192 mM- Tris 25 mM pH 8,3 auquel on a rajouté du méthanol à 20%). On découpe ensuite la membrane aux dimensions du gel (9,5 cm x 7,2 cm). Celle-ci est hydrophobe et on augmente sa capacité d'interaction avec les protéines en la plaçant dans un bain de méthanol. On veille à la rincer avec le tampon de transfert.

L'appareil d'électrotransfert est composé de deux plaques de graphite qui constituent deux électrodes. Entre ces plaques, on place dans l'ordre un film de polyéthylène, du papier Whatman imbibé de tampon de transfert, la membrane, le gel puis à nouveau du papier Whatman et un film de polyéthylène.

On doit veiller à ce qu'aucune bulle d'air ne reste entre la membrane et le gel. Les bulles constitueraient des points de haute résistivité et perturberaient le bon transfert. On applique ensuite entre les deux électrodes une intensité de 300 mA pendant 90 min.

On peut vérifier que le transfert s'est bien effectué en observant la présence des marqueurs colorés sur la membrane et ou en colorant les polypeptides par une solution de rouge Ponceau 0,2 % dissous dans un mélange H<sub>2</sub>O + 40% Ethanol +10% Acide Acétique. Après ce contrôle, rincer à l'eau et par une solution tampon PBS (NaCl 8g + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5g + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g dissous dans 1 l de H<sub>2</sub>O, pH 7,4 et auquel on rajoute du Tween 20 à 0,1%). La membrane est ensuite mise à incuber dans la solution PBS contenant 2 % de SAB afin de saturer les sites de fixation non spécifiques aux protéines que l'on désire détecter. L'incubation dure 1 h à 37 °C ou une nuit à 4 °C. On rince la membrane 3 fois x 5 min avec du PBS.

La membrane est alors prête pour l'incubation avec l'anticorps primaire spécifique (polyclonal de lapin) à la protéine que l'on désire marquer. Cette incubation dure 2 h à la température ambiante sur un agitateur. Si l'on souhaite réaliser un témoin de spécificité, on traite une autre membrane avec un sérum pré immun de lapin ou de souris.

La révélation immunoenzymatique se fera par le biais de l'incubation de la membrane avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la Peroxydase (produit commercial) qui va reconnaître et se fixer spécifiquement à l'anticorps primaire. Après ce couplage, il est nécessaire de procéder à des lavages successifs (3 fois 5 min) avec le tampon PBS.

La révélation de l'activité Peroxydase se fait par incubation avec du Chloronaphtol ou du DAB (Diaminobenzidine) dissous dans le tampon PBS sans Tween 20 et en présence

de  $H_2O_2$ . Le produit de la réaction est colorée sur la membrane et permet donc de visualiser la protéine ou les polypeptides constitutifs de la molécule recherchée. Les membranes sont rincées à l'eau et séchées et conservées à l'abri de la lumière et conservées au congélateur en attendant d'être photographiées.

#### Application Pratique :

On dispose d'anticorps polyclonaux de la RuBiSCO (la protéine a été purifiée à partir des feuilles vertes de Tabac et injectées à des lapins). Après un temps d'immunisation, on a prélevé le sérum des lapins contenant les anticorps recherchés. Nous allons donc procéder à la caractérisation immunochimique de la carboxylase ou de leurs polypeptides constitutifs (sous-unités) dans les différents extraits protéiques préparés.

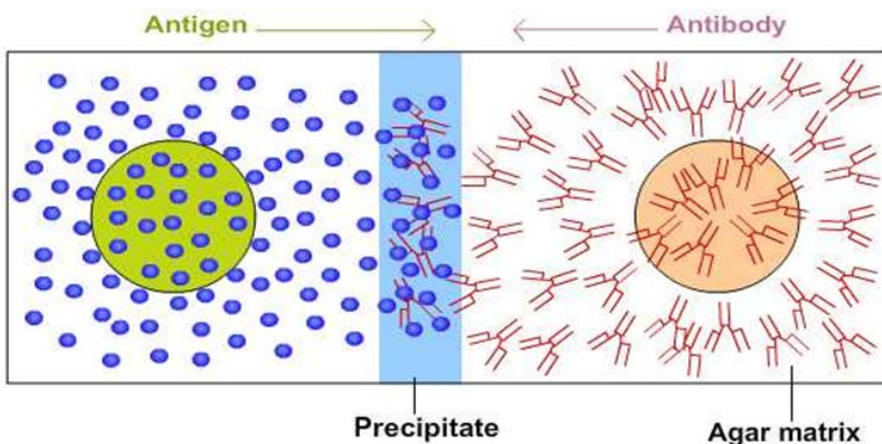
#### ESSAIS DE CARACTERISATION DE LA RUBISCO ET DE LA PEPCASE PAR TESTS DE DOUBLE DIFFUSION OU OUCHTERLONY

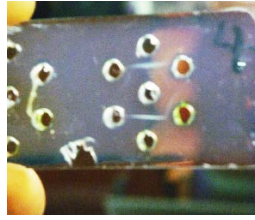
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/ATP/immuz.htm>

#### Principe

La méthode de double diffusion en gel d'Ouchterlony est une méthode d'immunoprécipitation fondée sur la diffusion d'antigènes et d'anticorps en milieu solide (en général un gel d'agarose) à partir de puits placés en vis à vis. Lorsque les molécules d'anticorps rencontrent les molécules d'antigènes, la liaison antigène-anticorps conduit à la précipitation des complexes immuns dans la zone de rencontre si l'anticorps reconnaît l'antigène. Le précipité se forme dans la zone où les concentrations des deux solutions sont optimales pour que la quantité d'anticorps sature les sites antigéniques, c'est à dire la zone d'équivalence.

#### DOUBLE IMMUNODIFFUSION





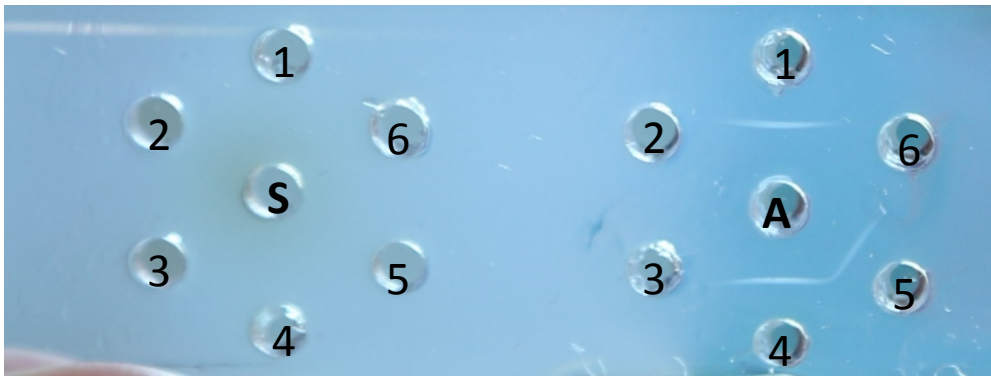
Les précipités se présentent sous la forme d'un arc blanchâtre visible à l'œil nu. La méthode d'Ouchterlony peut être utilisée notamment pour détecter la présence d'anticorps spécifiques dans un sérum, pour mettre en évidence un antigène donné dans un liquide biologique, pour déterminer la zone d'équivalence ou pour évaluer le degré d'identité (nul, total ou partiel) entre différents antigènes.

En effet, des antigènes possédant une identité partielle avec celui contre lequel ont été produits les anticorps sont susceptibles de donner une réaction croisée conduisant à des arcs de précipitation d'aspect particulier.

On peut ainsi identifier des relations de parenté entre les organismes dont proviennent les antigènes et celui ayant fourni les anticorps. En outre, la position du précipité dépendant de la concentration relative des antigènes et des anticorps, il s'agit d'une méthode semi-quantitative.

La technique de double diffusion peut être réalisée en boîte de Pétri ou sur lame. Un gel d'agarose est coulé, soit au fond de boîtes de Pétri de 50 mm de diamètre, soit sur des lames porte-objet de microscopie, et des puits équidistants sont creusés dans le gel.

Un immunosérum dirigé contre un antigène déterminé est placé dans le puits central et les solutions d'antigènes à tester sont placées dans les puits périphériques. Après quelques heures de diffusion, les arcs de précipitation sont examinés à l'œil nu mais ils peuvent aussi être colorés pour améliorer leur visibilité.



Exemple de Détection immunologique de la RuBisCO dans les tissus végétaux révélée par la méthode d'Ouchterlony. Dans les puits 1 à 6 on peut déposer des extraits protéiques bruts correspondant à différents lots à examiner respectivement. On doit aussi réaliser un contrôle négatif avec un sérum préimmun SPI dans le puits S à côté du test positif dans le puits AC un anticorps polyclonal de la RuBisCO de tabac.

## Protocole

### Préparation des gels

- Mélanger 1,5 g d'agarose et 100 mL de tampon PBS dans un flacon. Chauffer au bain marie à 100°C ou au four à microondes en remuant de temps en temps jusqu'à ce que la solution soit transparente (tout l'agarose doit être parfaitement dissous). Lorsque le flacon peut être saisi dans la main sans se brûler (environ 60 °C), couler l'agarose sur son support sur une épaisseur d'environ 1 à 1,5 mm.
- Le support du gel peut être constitué par des lames porte-objet de microscopie (environ 3 mL par lame) en évitant que l'agarose coule en dehors.
- Pour le coulage, boîtes et lames doivent être disposées sur un plan parfaitement horizontal. Après coulage, laisser refroidir les gels jusqu'à solidification.
- Percer les puits dans le gel avec un emporte-pièce de diamètre 5 mm pour les boîtes ou de diamètre 3 mm pour les lames. Un tube de verre muni d'une poire (pour aspirer l'agarose à éliminer) est suffisant pour percer les puits.

### Dépôt des solutions et diffusion

- Sécher ensuite le fond de chaque puits avec un essuie-tout enroulé à la dimension du diamètre des puits. Placer dans le puits central une goutte d'immun sérum (sérum de lapin anti RuBisCO ou antiPEPCase).
- Placer dans les autres puits une goutte de solution des différents antigènes à tester et noter leur emplacement pour pouvoir les identifier après diffusion. Mettre les boîtes à incuber à température ambiante dans une enceinte légèrement humidifiée par du papier filtre imprégné d'eau. Les résultats peuvent être lus 24 h plus tard. Il est possible de colorer les arcs de précipitation par le noir amido après dessiccation du gel. Pour cela, rincer les gels dans des bains successifs de tampon PBS et les sécher. Les placer ensuite dans une solution de noir amido pendant 2 minutes. Décolorer par des bains successifs d'acide acétique à 5 % puis laisser sécher. La rétraction de l'agarose lors de la dessiccation laisse une mince pellicule solide permettant de conserver le support coloré indéfiniment.

## Quelques données et résultats expérimentaux

---

### Estimations semi-quantitatives des Protéines Solubles Totales

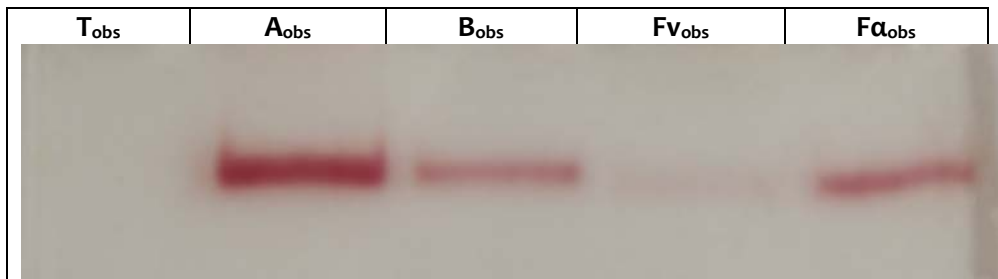
|   |                  |
|---|------------------|
| Feuilles vertes vitroplant Tabac à la lumière:    | 7610 µg par gMF  |
| Feuilles étiolées vitroplant Tabac à l'obscurité: | 3290 µg par gMF  |
| Feuilles vitroplant tabac albina à la lumière:    | 5460 µg par g MF |
| Feuilles vitroplant tabac albina à l'obscurité:   | 3230 µg par g MF |
| Feuilles Blé à la lumière;                        | 18120 µg par gMF |
| Feuilles Blé à l'obscurité:                       | 9980 µg par gMF  |
| Racines de blé:                                   | 1650 µg par gMF  |
| Racines de Maïs :                                 | 3000 µg par gMF  |
| Maïs Etiolé :                                     | 34000 µg par gMF |
| Maïs Vert :                                       | 50000 µg par gMF |

Quelles conclusions peut-on en tirer ?

#### Cultures In Vitro

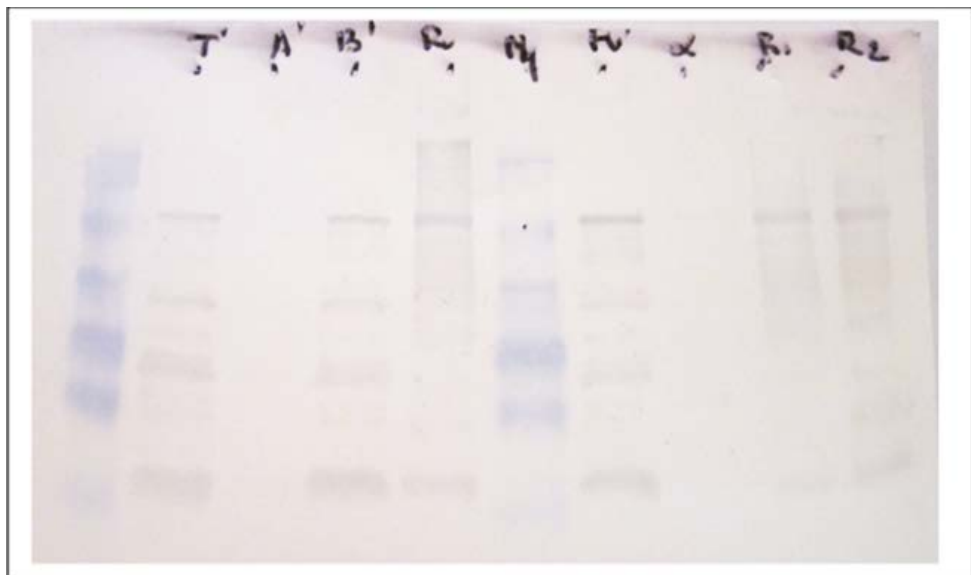
|  |                 |
|--|-----------------|
| Témoin : culture dans un milieu sans hormone:    | 330 µg par gMF  |
| A: culture dans un milieu enrichi en auxines :   | 950 µg par gMF  |
| B: culture dans un milieu enrichi en cytokinines | 1500 µg par gMF |

## Révélation sur gel natif de l'activité PEPCase



Electrophorèse sur gel natif d'Acrylamide montrant la variation de l'activité de la PEPCase en fonction des stades morphogénétique, et de présence/absence de chlorophylle (tabac albina) et des conditions lumineuses.

## Révélation de la RubiSCO par Western Blot



Immunoempreintes de RuBisCo après électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)



## TP4 : Impacts du signal d'imbibition des différentes semences végétales pour la levée de la dormance et le déclenchement de la germination. Analyse et caractérisation biochimiques des différentes séquences du développement

---

### Démarche pédagogique

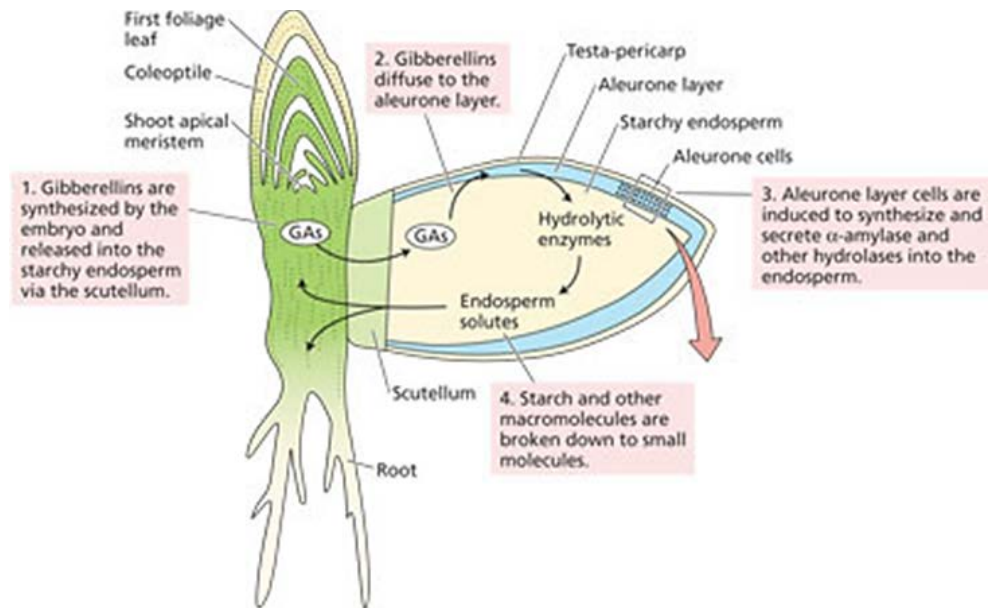
Il s'agit ici de caractériser les phénomènes physiques et biochimiques qui accompagnent un événement fondamental dans la vie et la construction de la plante : la germination.

### Mots-clés

Germination, activation du métabolisme, dégradation des réserves, imbibition, amylase, amidon

### Fondamentaux

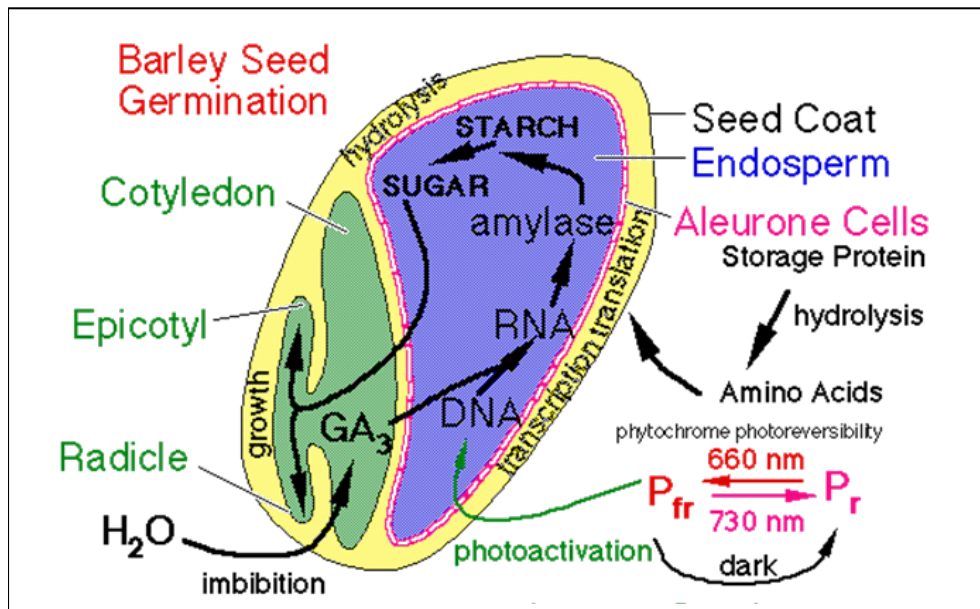
La germination est une phase physiologique qui correspond à la transition de la phase de vie latente de la graine sèche à la phase de développement de la plantule. Le processus de germination commence dès que la graine sèche est hydratée. La prise d'eau correspond à la reprise du métabolisme (absorption de l'eau, imbibition, respiration, activités enzymatiques) d'un embryon, jusqu'à ce qu'il devienne une jeune plante autotrophe.



### Pour en savoir plus:

Integration of molecular biology, physiology and phenotypic approaches to develop early seedling vigour traits in rice (Tiré de Early seedling vigour, an imperative trait for direct-seeded rice: an overview on physio-morphological parameters and molecular Markers by A. Mahender, A. Anandan, S. K. Pradhan Planta (2015) 241:1027–1050"

Suivant la conception des physiologistes, la germination commence avec l'imbibition de la graine et finit avec la percée des téguments par la radicule ou par l'hypocotyle s'il sort le premier, les étapes ultérieures étant des étapes de croissance.



D'une manière générale la séquence d'événements intervenant est la suivante :

1. Imbibition des éléments vivants déshydratés et gonflement de la graine.
2. Démarrage de la digestion des réserves.
3. Grandissement des cellules de la radicule déjà formée dans l'embryon puis prolifération des cellules du méristème racinaire.
4. Eclatement des téguments et sortie de la radicule.
5. Développement de la partie aérienne et libération des téguments

Le premier phénomène réside dans une imbibition de la graine c'est-à-dire une phase d'hydratation du protoplasme qui amène la teneur en eau à environ 50 à 60 % du poids frais.

Cette phase d'hydratation permet la reprise des activités métaboliques qui se manifeste très rapidement dès le début de l'imbibition. Les enzymes d'hydrolyse des réserves vont donner les métabolites nécessaires à la synthèse des constituants des nouvelles cellules ou utilisés comme substrats respiratoires.

## Conditions de la germination

La germination de la graine va dépendre :

- des conditions externes liées aux facteurs de l'environnement
- des conditions internes liées à l'état physiologique et aux caractéristiques de la graine.

Conditions externes :

- Eau : nécessaire à l'hydratation de la graine et à la reprise des activités métaboliques (trop d'eau empêche cependant la germination : asphyxie).
- O<sub>2</sub> : nécessaire à la respiration.
- Température : convenable pour les activités métaboliques.
- Lumière : 3 catégories : germination induite par la lumière, germination inhibée par la lumière, germination indifférente.

### Contrôle hormonal de la levée de dormance des semences :

En particulier dans les levées de dormance par le froid, il semble que l'on soit en présence d'un équilibre entre l'acide abscissique (ABA) et gibbérelline analogue à celui décrit pour la dormance des bourgeons. L'acide abscissique semble être l'inhibiteur fondamental, il est présent dans de nombreuses graines et il présente un puissant effet inhibiteur sur la germination quand il est apporté de façon exogène. Par ailleurs, il existe des corrélations entre degré de dormance d'espèces voisines dans un même genre et la teneur en acide abscissique.

Le froid pourrait intervenir en diminuant le taux d'ABA des graines. De plus, des stimulateurs comme l'acide gibbérellique semblent impliqués dans la germination.

Enfin, le rôle de l'acide gibbérellique est clairement démontré par le comportement de mutants déficitaires en GA qui ne germent pas sans apport exogène de GA.

### Amylases et gibbérellines

Les hypothèses concernant le mode d'action des gibbérellines sur la croissance découlent d'expériences réalisées sur les grains d'orge. Ces caryopses sont constitués par un embryon à un cotylédon (le scutellum) et par l'albumen ; l'ensemble est entouré de trois assises de cellules riches en grains d'aleurone et des enveloppes (téguments et péricarpe soudés).

Les gibbérellines seraient le principe inducteur, car en solution elles induisent l'hydrolyse de l'amidon (donc la synthèse d' $\alpha$ -amylase) dans la partie du grain dépourvue d'embryon.

Les gibbérellines, synthétisées, ou libérées à partir de composés inactifs après l'imbibition de l'embryon, induisent une néosynthèse d' $\alpha$ -amylase et non pas une

activation de molécules enzymatiques préexistantes. Cette néosynthèse s'étend à l'ensemble des enzymes hydrolytiques : protéases, nucléases.

Pour expliquer l'influence des gibbérellines sur la croissance, plusieurs hypothèses ont été proposées :

- stimulation de la synthèse des protéases ce qui entraîne une augmentation de la teneur en acides aminés (en particulier le tryptophane, substance mère de l'AIA) ;
- stimulation de la synthèse d'enzymes hydrolytiques telles que les cellulases dont l'action pourrait provoquer une augmentation de la plasticité de la membrane ;
- stimulation de la synthèse d'enzymes hydrolytiques, ce qui conduit à une hydrolyse importante des réserves, donc à une augmentation de la succion des cellules et par conséquent à un appel d'eau.



Quantité d'eau absorbée par des graines de différentes espèces après 24h d'imbibition.

| Espèce | Poids initial(g) | Poids 24h (g) | Qté d'eau | % en eau |
|--------|------------------|---------------|-----------|----------|
| Maïs   | 4.08             | 5.52          | 1.44      | 35,29%   |
| Blé    | 1.28             | 2.8           | 1.52      | 118,75%  |
| Riz    | 0.96             | 1.29          | 0.33      | 34,37%   |
| Orge   | 1.32             | 1.93          | 0.61      | 46,21%   |

## Les Amylases

L' $\alpha$ -amylase (ou diastase ou takadiastase) fut la toute première enzyme qui fut découverte en 1833 par Anselme Payen et Jean-François Persoz. (Payen et Persoz, « Mémoire sur la diastase, les principaux produits de ses réactions et leurs applications aux arts industriels », Annales de chimie et de physique, 2e série, t. 53, 1833, p. 73-92, consultable sur Google Books)

L' $\alpha$ -amylase (EC3.2.1.1) est une enzyme digestive classée comme glycosidase. Durant la germination, l'amidon de l'albumen est hydrolysé en sucres solubles réducteurs sous l'action de l' $\alpha$ -amylase.

Cependant, si un grain est coupé en deux transversalement, seule la moitié contenant l'embryon produit des sucres réducteurs à partir de l'amidon ; l'embryon est nécessaire à la production d' $\alpha$ -amylase par la « couche à aleurone ».

Les amylases sont des enzymes qui hydrolysent les polysaccharides. Ce sont des constituants du suc pancréatique et de la salive, requis pour le catabolisme des glucides à longue chaîne (comme l'amidon) en unités plus petites.

L' $\alpha$ -amylase transforme l'amidon en sucre dans le grain en germination, et de même liquéfie les granules d'amidon dans la farine de blé lorsqu'on la mélange à de l'eau pour en faire de la pâte à pains.

Elle est également synthétisée dans les fruits de beaucoup de Plantes durant leur maturation (c'est ce qui rend leur goût si doux et sucré), et aussi pendant la germination des graines. L'amylase est entre autres responsable de la production de malt.

Les amylases catalysent l'hydrolyse de l'amidon, polymère du glucose. La molécule d'amidon est en effet constituée de molécules de glucose enchaînées les unes aux autres. Ce corps représente la principale forme de réserve des glucides produits par les plantes au cours de la photosynthèse. On le trouve dans les graines et dans les organes de réserve comme les tubercules de pommes de terre.

L' $\alpha$ -amylase brise les liaisons  $\alpha(1\rightarrow4)$  glycosidiques à l'intérieur des chaînes de l'amylose et de l'amylopectine pour ultimement donner des molécules de maltose (disaccharides de  $\alpha$ -glucose) détectées grâce à la liqueur de Fehling.

L'amidon (substrat) est coloré en bleu par l'iode (Réactif Iodo-ioduré), alors que le maltose (produit) ne l'est pas. On peut donc suivre la disparition du substrat et de ce fait l'apparition du produit par colorimétrie.

Utiliser un filtre rouge de bande passante 680 nm +/- 50 nm.

### Extraction:

Préparation du substrat : Empois d'amidon à 1/1000.

Délayer 1 g d'amidon technique ou d'amidon soluble dans 100 ml d'eau froide ; verser dans 900 ml d'eau en ébullition, en remuant, retirer aussitôt du feu et laisser refroidir. Cet empois servira de « préparation de base ».

Réactif iodo-ioduré : Liquide de Lugol 125 mL ou Liquide de Lugol 1L .Solution à 1 pour 1 000 : 5 gouttes pour 100 ml de substrat pour obtenir une coloration bleu-pâle.

### Suivi de la réaction

L'amidon (substrat) est coloré en bleu par l'iode (Réactif Iodo-ioduré), alors que le maltose (produit) ne l'est pas. On peut donc suivre la disparition du substrat et de ce fait l'apparition du produit par colorimétrie.

Utiliser un filtre rouge de bande passante 680 nm +/- 50 nm.

### Extraction:

Amylase de l'orge ou de riz (alpha et beta amylases) : Broyer 20 à 50 g de grains germés dans 100 ml d'eau ou une solution Tampon 0,1M Tris-10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de Dithiotréitol Ph8. Laisser reposer 10 min et filtrer sur papier. Le filtrat contient les amylases.

Préparation du substrat : Empois d'amidon à 1/1000.

Délayer 1 g d' amidon technique ou d' amidon soluble dans 100 ml d'eau froide ; verser dans 900 ml d'eau en ébullition, en remuant, retirer aussitôt du feu et laisser refroidir. Cet empois servira de « préparation de base ».

Réactif iodo-ioduré : Liquide de Lugol 125 mL ou Liquide de Lugol 1L .Solution à 1 pour 1 000 : 5 gouttes pour 100 ml de substrat pour obtenir une coloration bleu-pâle.

### Approche Expérimentale

Vingt grains (20) de Riz (variété IR64) ont été mis en imbibition pendant 16-24h dans de l'eau et dans une solution d'Acide Gibbérellique 1 uMolaire.

Un autre lot de graines après imbibition dans l'eau a été mis à germer pendant 6 jours, à la lumière ou à l'obscurité.

Après ces traitements, tous les lots ont été broyés dans une solution Tampon 0,1 M Tris-10mM MgCl<sub>2</sub>- 5 mM DTT pH8. Après une centrifugation à 4°C à 13000xg pendant 15 minutes, les surnageants sont récupérés, leur volume mesuré et un dosage colorimétrique des protéines selon Bradford est effectué.

Nous disposons des lots différents :

- graines imbibées dans l'eau
- graines imbibées dans une solution de l'acide gibbérellique
- feuilles vertes de plantules de Riz de 6 jours
- feuilles étiolées de plantules de Riz de 6 jours
- graines avec les racines des plantules de Riz de 6 jours à la lumière
- graines avec les racines des plantules de Riz de 6 jours à l'obscurité.

Les différents extraits protéiques seront analysés pour l'expression des carboxylases (RuBisCO et PEPCase) et des alpha- et beta- amylases par approches immunochimiques (Double diffusion en Outchterlony) et en Western Blots après séparation sur gels PAGE-SDS et transferts sur membranes de nitrocellulose.



Des anticorps polyclonaux des alpha amylases produits par des lapins ont été achetés dans le commerce, l'un venant de Santa Cruz ( H281 Ref sc-25562) et l'autre de Agrisera Antibodies ( Ref AS10712) ont permis une caractérisation par Western Blots .

### Références

René Heller, Robert Esnault, Claude Lance 6e Edition de l'abrégé DUNOD 1er et 2e cycles Physiologie végétale 2. Développement

### Des idées de Travaux Pratiques sur le même sujet :

- Paramètres de la germination

<https://sites.google.com/site/rgraphiques/tp---biometrie---agronomie---iut-de-perigueux>

- Hydrolyse de l'amidon

<http://www.jeulin.fr/fr/a-a1023719-edc1000005/ressource/1001176/TP-Hydrolyse-de-l-amidon-par-l-amylase.html>

- Action des gibbérellines

<http://irifaahee.free.fr/Cours/TP%20Gibb/TPgibb.pdf>

## TP5 : Plasticité génomique : Apport de la PCR (Polymerase Chain Reaction) dans la détection de transgènes. Exemples d'étude chez *Arabidopsis* et chez un Riz OGM

---

### Démarche pédagogique

Après être passés de l'observation de la plasticité phénotypique des plantes à l'analyse biochimique de quelques fonctions fondamentales (photosynthèse, germination) *via* l'étude de systèmes enzymatiques simples (carboxylase, amylases), nous poursuivons notre itinéraire pédagogique par l'analyse de l'ADN.

- De l'analyse phénotypique (TP1) à la protéomique (TP2)
- De la protéomique (TP3 ; TP4) à la génomique (TP5 et TP6).

Les séances de travaux pratiques se concentreront sur les techniques à base de détection d'ADN recombinant (Réaction PCR).

Le présent module de Travaux Pratiques s'inspire directement des travaux en cours dans l'équipe de recherche de Laurence Albar, basée à l'IRD Montpellier, dans le domaine de la génomique fonctionnelle du riz.

Le but n'est pas la mise au point de plantes OGMs à vocation commerciale, ni de détecter des traces d'OGMs dans des préparations agro-alimentaires.

Il s'agit d'utiliser la transgénèse pour comprendre chez le riz la tolérance à une virose extrêmement grave, causée par le RYMV (Rice Yellow Mottle Virus).

L'équipe de L. Albar a montré que le gène *elF(iso)4G* (un facteur d'initiation de la traduction) jouait un rôle considérable dans la résistance au RYMV.

En effet, la transformation stable d'une lignée de riz résistante au RYMV avec le cDNA de ce gène est capable de faire perdre le caractère résistant aux plantes transformées.

### Mots-clés

ADN, Génome, plasticité génomique, PCR, OGM, transgène, transformation génétique, génie génétique.

### Fondamentaux

Un organisme génétiquement modifié (OGM) est un organisme vivant (végétal, animal, bactérie) dont le patrimoine génétique a subi des modifications, par ajout ou délétion d'un ou de plusieurs gènes conférant une caractéristique nouvelle. C'est un organisme dont le matériel génétique a été modifié par le biais de la technologie génétique. Cette modification ne se produit pas par multiplication ou recombinaison naturelle. Cette transformation du patrimoine génétique consiste généralement en l'introduction ou la délétion d'un fragment d'ADN à l'intérieur de celui-ci. Cette modification généralement conduit à la production de protéines qui confèrent de nouveaux caractères à l'organisme

génétiqnement modifié. Parmi les gènes codant pour des protéines généralement retrouvées chez tout OGM se retrouve au moins un gène de résistance (à un antibiotique, à un désherbant ou à une toxine) permettant la sélection des OGM, et un gène conférant le ou les nouveaux (x) caractère (s).

## Détection d'OGM par la Réaction de Polymérisation en Chaîne ou PCR

### 1- Définition

C'est une technique permettant une amplification in vitro de séquence d'ADN à partir de quantités infinitésimales de matériel de départ. Elle permet en principe, à partir d'une seule molécule, de détecter la présence d'ADN transgénique. Deux types de détection peuvent être envisagés :

- De nombreux OGM sont construits suivant des modèles semblables (promoteurs, gènes de résistance, gènes de visualisation, etc...). La simple détection d'un de ces motifs permet d'affirmer que nous sommes en présence d'OGM, mais pas quel est le type d'OGM impliqué. Par ailleurs, certains végétaux présentent la particularité d'être naturellement reconnu par le test. Il s'agit de faux positifs.
- La seconde technique consiste à détecter le gène codant pour l'une des protéines conférant de nouvelles caractéristiques à la plante. Il est alors possible d'identifier le type d'OGM impliqué. Mais cette technique demande que l'on sache réellement ce que l'on cherche : elle différencie les produits contenant du soja transgénique par rapport à ceux contenant du maïs transgénique, mais si elle détermine qu'il n'y a pas de soja transgénique dans un produit, elle ne permet pas d'affirmer qu'il ne contient pas de maïs transgénique (ou vice versa).

### 2- Applications de la PCR

Elles sont très variées :

- la préparation des sondes moléculaires pour rechercher un gène d'intérêt
- le clonage des gènes codant pour une protéine d'intérêt (Insuline, anticorps)
- l'étude de la susceptibilité génétique (cancer du col de l'utérus)
- l'étude de la diversité génétique (plantes, paludisme)
- la détection de micro-organismes et plantes (OGM, bactéries)
- les applications de la médecine légale (recherche des empreintes génétiques)

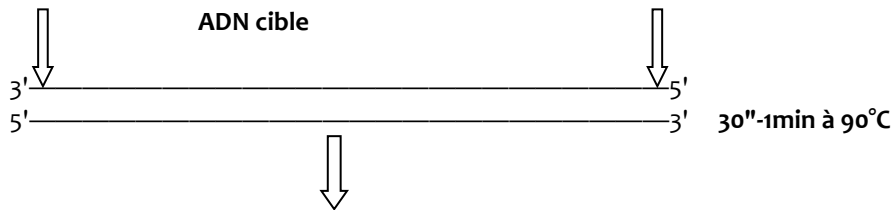
### 3- Principe

La PCR est basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser à partir d'une amorce un brin complémentaire à un fragment d'ADN. Elle a été mise au point par K. Mullis en 1985.

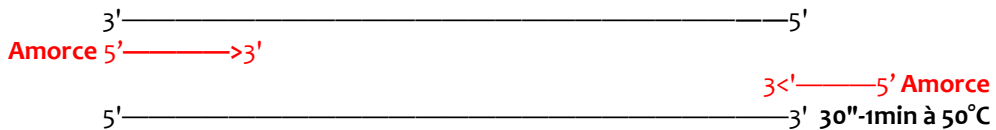
La réaction comprend plusieurs cycles. Chaque cycle comprend 3 étapes :

1. L'étape de dénaturation: l'ADN contenant le segment à amplifier est chauffé à une température d'environ 94°C en présence des autres composantes. Il s'ensuit une séparation (dénaturation) des brins de l'ADN
2. -L'étape d'hybridation: ici la température est baissée (entre 40°C et 70°C) afin que chacune des amorces s'hybride de façon spécifique à l'extrémité de chaque brin dont elle est complémentaire
3. L'étape d'élongation: la température est de nouveau remontée pour permettre à l'ADN polymérase de répliquer l'ADN dans les conditions optimales. Au cours d'un cycle la quantité de DNA cible est doublée

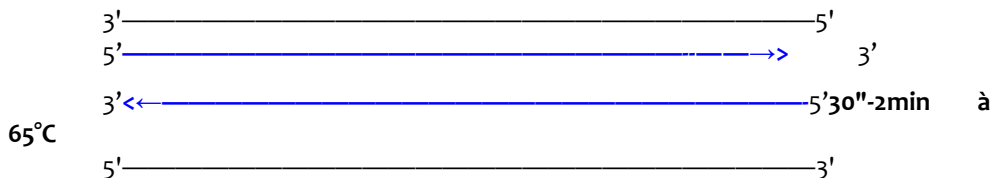
## 1 Etape de séparation des brins



## 2 Etape d'hybridation des amorces



## 3 Etape d'élongation par la Taq ADN Polymérase



## 4- Composantes du milieu réactionnel de la PCR

1. L'ADN: il est obtenu à partir de liquides biologiques (sang, salives, etc..), des organes animaux et végétaux, des microorganismes, des virus...

2. Les oligonucléotides ou désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP): ce sont les unités de bases utilisés pour la synthèse de nouveaux brins
3. L'enzyme: c'est la polymérase thermostable *Taq* qui a été purifiée à partir de la bactérie *Escherichia. Coli* par clonage du gène de la *Taq* DNA polymérase. Elle possède deux activités :
  - L'activité 5' → 3' polymérasique qui permet la synthèse de nouveaux brins
  - L'activité 5'→ 3' exonucléasique qui permet de corriger les erreurs de synthèse
4. La *Taq* polymérase a pour rôle de synthétiser le brin complémentaire à partir des amorces
5. Les amorces ou primers: ce sont de courtes séquences d'ADN ou d' ARN d'environ 20 à 30 nucléotides complémentaires du début d'une séquence et servant de point de départ à la synthèse du brin complémentaire par la polymérase
6. D'autres composants interviennent pour jouer différents rôles
  - Magnésium: stabilise les oligonucléotides et la réaction
  - Tampon Tris-HCL: permet de maintenir le PH du mélange à une valeur constante optimale
  - KCL: facilite et stabilise la réaction d'hybridation des brins d'ADN
  - DMSO : évite la formation de structure secondaire

## 5- **Application de la PCR pour la détection d' *Arabidopsis thaliana* transformée**



*Arabidopsis thaliana*

L'espèce *Arabidopsis thaliana* est de la famille du chou (*Brassicaceae*). Elle a été découverte au 16<sup>è</sup> siècle par Johannes Thal. Elle est aussi nommée arabette rameuse. Plus de 750 accessions naturelles d'*Arabidopsis thaliana* ont été collectées dans le monde et sont disponibles dans les 2 centres de semences ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*) et NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Centre*).

*Arabidopsis thaliana* a été choisie comme espèce modèle pour les études de génétique et de génomique fonctionnelle. C'est une petite plante qui présente divers avantages :

- le plus petit génome parmi les plantes supérieures séquencées. Par comparaison, le riz et le maïs ont un génome respectivement 4 et 20 fois plus grand
- une petite taille (infrastructure légère pour la cultiver)
- reproduction principalement par autofécondation.
- un cycle de reproduction court (6 semaines de la germination à la graine mature)

*Arabidopsis thaliana* est intéressante en génie génétique parce que l'identification de la fonction de ses gènes a des retombées chez les espèces cultivées.

En voici quelques exemples :

- des gènes impliqués dans la libération des graines ont permis d'améliorer la production chez le colza
- des gènes responsables de la maturation des fruits ont permis d'augmenter la production de la tomate
- des homologues des gènes codant 2 enzymes impliquées dans le métabolisme de lipides poly-insaturés ont été identifiés chez le soja. Dans une variété transgénique de soja (où l'expression de l'un de ces 2 gènes a été supprimée), l'abondance des lipides mono-insaturés est passée de 25% à 85% et celle des lipides poly-insaturés est passée de 60% à 2%.

- Protocole d'extraction de l'ADN

1. Le matériel végétal (500 mg) est broyé dans l'azote liquide et dissous dans 7,5 ml de tampon d'extraction préchauffé à 60° C.
2. Le tout est incubé à 60°C au bain marie pendant 30 min.
3. Le mélange est suspendu dans un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1) et centrifugé à 20 ° C pendant 10 minutes à 1600g.
4. Le surnageant est mélangé avec 5 ml d'isopropanol au 2/3 et incubé à température ambiante pendant 2 h.
5. Le mélange est centrifugé comme ci-dessus et le culot est re-suspendu dans 15 ml d'éthanol à 76 % ml (v/v) dilué avec de l'acétate d'ammonium à 10 mM.
6. Le mélange est centrifugé de nouveau pendant 10 minutes à 1600g.
7. Le surnageant est soigneusement enlevé
8. Le culot est séché et resuspendu dans 1 ml de Tris-HCL 10 mM, pH 8.



9. Rajouter 10 µl de RNase A (1 µg/µl) et incubés à 37 °C pendant 30 min.
10. Rajouter, 2 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; 1 ml d'acétate ammonium 7,5 M, pH 7,7; et 10 ml d'éthanol 100 % puis incubé à -20°C pendant 2 heures.
11. Centrifuger à 14.000 rpm pendant 10 min à 4°C
12. Le culot (ADN génomique) est lavé deux fois dans l'éthanol à 70 % (v/v)
13. Le culot est ensuite séché et re-suspendu dans 100 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 et stocker à -20 °C.

● **Composition du tampon d'extraction d'ADN:**

3,5 % (p/v) CTAB (bromure d'hexadécyltriméthylammonium), Tris-HCl 100 mM, pH 8.0; EDTA 20 mM pH 8.0; NaCl 1,4 M; 0,2 % (v/v) 2-mercaptoethanol sera ajouté extemporanément (avant extraction du DNA)

● **Réalisation de la PCR :**

La réaction a lieu dans de petits tubes eppendorf de contenance variable selon le volume du milieu réactionnel.

Les tubes ainsi constitués sont placés dans un thermocycleur programmé comme suit : L'ADN ainsi amplifié est visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose en présence du BET (Bromure d'Ethidium). Le BET est un agent qui s'intercale entre les bases de l'ADN et émet une fluorescence lorsqu'il est exposé à la lumière Ultraviolette.

**NB : Le BET est hautement cancérigène.**

● **Électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose**

Les multiples applications scientifiques et technologiques impliquant l'étude de l'ADN font appel à différentes techniques. Parmi elles, l'électrophorèse sur gel d'agarose est une des plus communément utilisées car elle permet de séparer des molécules en fonction de leur taille, préalable indispensable dans de multiples applications, notamment pour identifier des fragments d'ADN en présence d'un marqueur de taille (Ladder).

## Mise en pratique de l'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

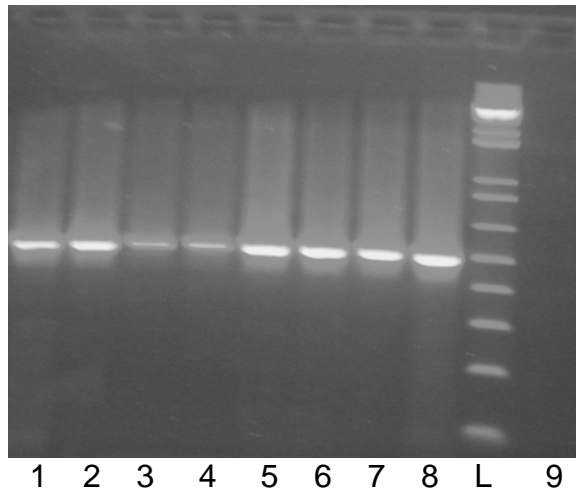
**Préparation du Gel d'agarose**

- 1- Mélanger tampon TBE (Tris-borate EDTA) et agarose à raison de 1g d'agarose pour 100 ml de tampon (la proportion d'agarose dépend de la taille des molécules d'ADN à séparer).
- 2- Faire fondre l'agarose au four à micro-ondes en surveillant pour éviter les projections ou au bain marie. Agiter de temps à autre pour homogénéiser le mélange.
- 3- Laisser refroidir jusqu'à ce qu'il devienne possible de saisir le flacon à main nue (environ 60 °C).
- 4- Ajouter un volume approprié de BET puis homogénéiser délicatement pour éviter la formation de bulles d'air

- 5- Positionner le peigne à 1 mm du fond et à environ 1 cm de l'extrémité du support. Régler le niveau pour que le support de gel soit horizontal.
- 6- Couler lentement le gel sur 3 à 5 mm d'épaisseur en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne.
- 7- Laisser refroidir, enlever le peigne. Le gel est prêt pour le dépôt des échantillons.
- 8- Déposer 15 ul échantillons d'ADN amplifiés mélangés avec 5 ul de tampon de charge dans les puits
- 9- Laisser migrer sous tension (générateur) pendant 1h à 150 mV

### Révélation des bandes

Le gel doit être manipulé avec soin car il est très fragile. Déposer le gel sur un appareil à UV. A ce stade, les bandes sont observables à l'Ultraviolet. Photographier le gel avec un appareil numérique.



1-8 = tubes positifs  
L = marqueur de poids moléculaire  
9 = témoin négatif

## Exemple d'étude chez un Riz OGM

### Principe:

Nous allons vérifier l'efficacité de la transformation génétique en utilisant la PCR pour mettre en évidence la présence du gène *elF(iso)4G* dans les lignées transformées.

Nous utiliserons les lignées de riz non transformées comme témoins.

Nous allons tester deux conditions d'amplification PCR pour leur capacité à mettre en évidence le transgène.

Les amorces utilisées ont été destinées à visualiser l'amplification d'une séquence de 675bp d'ADN endogène et d'une bande supplémentaire de 455bp chez le transgène, correspondant à la taille du cDNA du gène *elF(iso)4G*.

Les Ta théoriques des amorces dessinées pour la détection du transgènes indiquent des conditions d'amplifications optimales entre 55 et 60°C. Nous allons tester ces deux températures pour leur capacité à amplifier correctement le transgène recherché et l'ADN endogène des témoins.

### Matériel Végétal

- Quatre lignées Témoin  
Gig – IR64 – Nip - NipR
- Six lignées transformées :  
T1.1 - T1.3 - T1.4 – T8-4 – T8.7 – T8.13

Les deux expérimentations ne varient que par les conditions de PCR

### Publication de référence :

*The Plant Journal* (2006) 47, 417–426

doi: 10.1111/j.1365-3113X.2006.02792.x

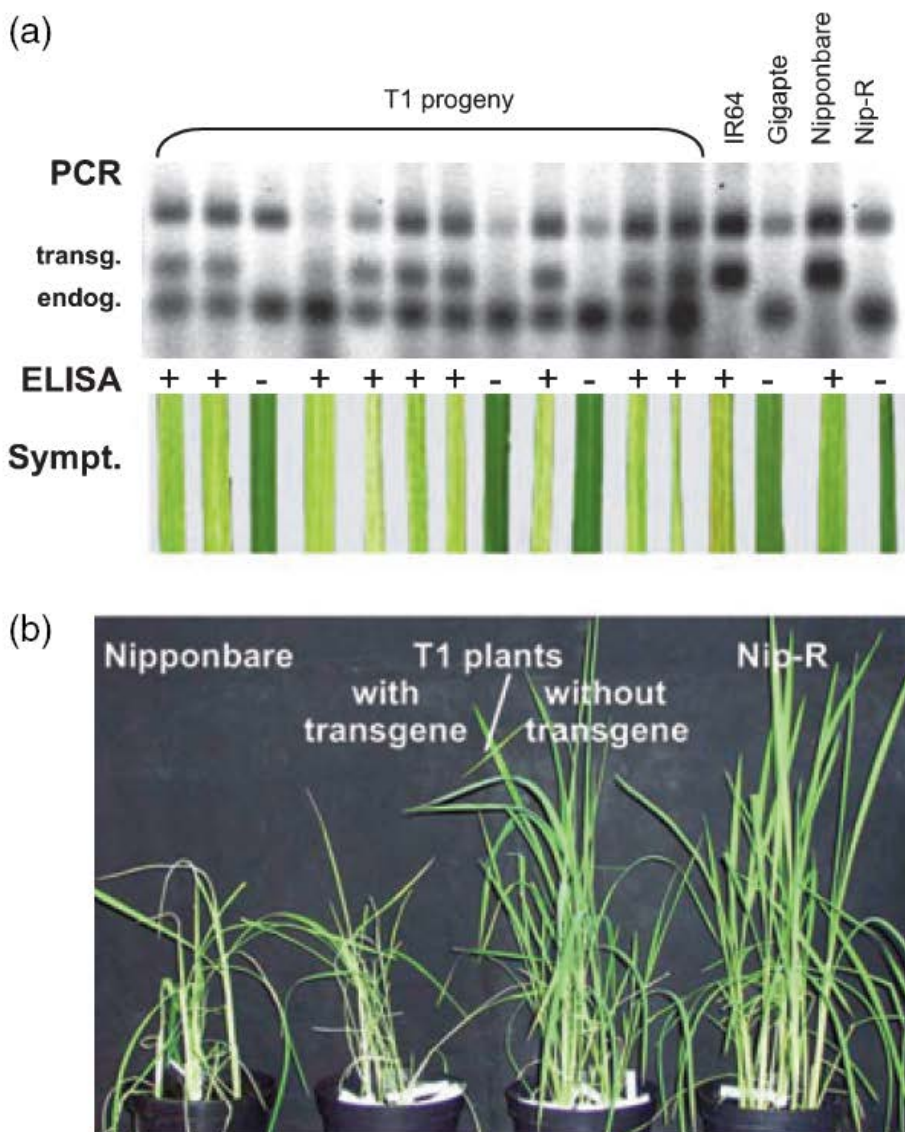
## Mutations in the *elF(iso)4G* translation initiation factor confer high resistance of rice to *Rice yellow mottle virus*

Laurence Albar<sup>1,\*</sup>, Martine Bangratz-Reyser<sup>1</sup>, Eugénie Hébrard<sup>2</sup>, Marie-Noëlle Ndjondjop<sup>3</sup>, Monty Jones<sup>3,†</sup> and Alain Ghesquière<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR 5096, IRD/CNRS/Université de Perpignan, BP 64501, 34394 Montpellier CEDEX 5, France,

<sup>2</sup>UMR 1097, IRD/CIRAD/Agro-MINRA, BP64501, 34394 Montpellier CEDEX 5, France, and

<sup>3</sup>Africa Rice Center, WARDA, 01 BP 2031, Cotonou, Benin



**Figure 4.** Transgene presence and RYMV resistance in T1 progenies.

(a) Analysis of 12 T1 progenies obtained from a T0 plant with a single copy of the transgene. The presence of the transgene was analysed using the AG925 marker. Resistance versus susceptibility to RYMV was assessed using virus detection with either ELISA or symptom observation after mechanical inoculation.

(b) Effect of virus inoculation on plant development on T1 plants, with or without the transgene, compared with the Nipponbare and Nip-R controls. Plants were inoculated 2 weeks after sowing and observed 4 weeks after inoculation.

## EXPERIMENTATION 1

### Milieu réactionnel:

|                 |                               |
|-----------------|-------------------------------|
| ADN             | 2 $\mu$ l                     |
| Primer Sens     | 0.2 $\mu$ l                   |
| Primer Antisens | 0.2 $\mu$ l                   |
| Taq Polymerase  | 0,2 $\mu$ l                   |
| dNTPs 5mM       | 0.2 $\mu$ l                   |
| Tampon 5X       | 2 $\mu$ l                     |
| H2o Stérile     | 5.2 $\mu$ l                   |
| <b>Total</b>    | <b>10,0 <math>\mu</math>l</b> |

Préparer un Master Mix pour 12 réactions

Un témoin négatif sera réalisé en omettant l'ADN (remplacé par 2ul H2o stérile)

### Programme PCR :

|              |               |   |
|--------------|---------------|---|
| Dénaturation | 94°C – 10 min |   |
| 35 cycles    | 94°C – 30 sec | } |
|              | 55°C – 30 sec |   |
|              | 72°C – 1 min  |   |
| Elongation   | 72°C – 7 min  |   |

### Electrophorèse :

Gel d' agarose2%/ tampon TAE0.5X

Dépose : 10 $\mu$ l Produits PCR

Migration: Tampon TAE 0.5X – 100V; 45 minutes

## EXPERIMENTATION 2

### Milieu réactionnel:

|                 |                               |
|-----------------|-------------------------------|
| ADN             | 2 $\mu$ l                     |
| Primer Sens     | 0.2 $\mu$ l                   |
| Primer Antisens | 0.2 $\mu$ l                   |
| Taq Polymerase  | 0,2 $\mu$ l                   |
| dNTPs 5mM       | 0.2 $\mu$ l                   |
| Tampon 5X       | 2 $\mu$ l                     |
| H2o Stérile     | 5.2 $\mu$ l                   |
| <b>Total</b>    | <b>10,0 <math>\mu</math>l</b> |

Préparer un Master Mix pour 12 réactions

Un témoin négatif sera réalisé en omettant l'ADN (remplacé par 2ul H2o stérile)

### Programme PCR :

|              |               |   |
|--------------|---------------|---|
| Dénaturation | 94°C – 10 min |   |
| 35 cycles    | 94°C – 30 sec | } |
|              | 60°C – 30 sec |   |
|              | 72°C – 1 min  |   |
| Elongation   | 72°C – 7 min  |   |

### Electrophorèse :

Gel d' agarose2%/ tampon TAE0.5X

Dépose : 10 $\mu$ l Produits PCR

Migration: Tampon TAE 0.5X – 100V; 45 minutes



## Cas d'étude

La bactérie *Xanthomonas oryzae* est responsable d'une maladie bactérienne du riz appelée « Kresék » en Asie du Sud-Est, qui occasionne des dégâts considérables dans les cultures.

Pour étudier les interactions moléculaires entre cette bactérie phytopathogène et son hôte, un procédé de transformation génétique utilisant *Agrobacterium tumefaciens* via un vecteur binaire a été développé à l'IRD.

## Objectif du TP

Afin de s'assurer de l'efficacité de la transformation génétique nous allons rechercher grâce à la technique PCR la présence du transgène dans un plant de riz transformé.

Le gène intégré à partir du vecteur binaire (cf. carte en annexe) comprend :

- un gène de sélection qui code pour une enzyme conférant la résistance à l'hygromycine. Ce gène est sous le contrôle d'un promoteur 35S.
- un gène rapporteur codant pour la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) qui émet une fluorescence verte sous UV. Ce gène est contrôlé par un promoteur Ubiquitine.

Des amorces PCR spécifiques ont été dessinées de part et d'autre du gène rapporteur GFP.

En présence du transgène, l'amplification PCR générera un fragment de 1010 bp, qui pourra être visualisé par électrophorèse sur un gel d'agarose.

Nous réaliserons un test d'amplification comparatif entre

- un ADN extrait d'un riz sauvage (**NT**)
- un ADN extrait d'un riz transformé (**T**)
- un ADN plasmidique correspondant vecteur binaire (**P**)

Nous testerons également la présence du gène SWEET14 constitutif du génome du riz impliqué dans le transport des sucres.

## Amplification par PCR

| Nom du gène | Amorce | Séquence des amorces (5'-3') | amplicon (pb) |
|-------------|--------|------------------------------|---------------|
| GFP         | GFP-F  | TGATGGCATATGCAGCAGCTATAT     | 1010          |
|             | GFP-R  | CGGCAACAGGATTCAATCTTAAGA     |               |
| SWEET14     | Os14-F | TCCAGGGTCACACACCATAAG        | 342           |
|             | Os14-R | TGCAGCAAGATCTTGATTAATA       |               |

### Echantillons d'ADN :

- 3 tubes : NT, T, P
- Solution à 50 ng/μL

### **Préparation de la réaction PCR :**

- La PCR sera réalisée en barrette de 0.2ml
- Dessiner le schéma réactionnel : nb de conditions (gène x échantillon)
- Réaliser un contrôle négatif (NTC = *no template control*, l'ADNc est remplacé par de l'eau) pour chaque gène étudié.
- Réaliser séparément pour chaque gène étudié un mélange de tous les composants nécessaires pour la réaction PCR, et ajouter l'enzyme polymérase en dernière position.

### **Mix réactionnel pour une condition (1 puits)**

|                             | Concentration initiale | Volume pour une réaction |
|-----------------------------|------------------------|--------------------------|
| Tampon 5X                   | 5X                     | 4 µL                     |
| dNTP mix                    | 2.5 mM                 | 0.4 µL                   |
| Primer F                    | 10 µM                  | 1µL                      |
| Primer R                    | 10 µM                  | 1µL                      |
| GO TAQ G2                   | 5U/µL                  | 0.1 µL                   |
| Eau RNase free (Vf : 18 µL) |                        | 11,5 µL                  |

- Répartir 18µL du mélange réactionnel dans chacun des puits
- Déposer 2µL d'ADN dans les 18µL de milieu réactionnel
- Mélanger puis réaliser un pulse à la centrifugeuse
- Lancer l'amplification dans un thermocycleur

### **Paramètres de l'amplification**

|                       | Amplification : 30 cycles |             |            |                   |
|-----------------------|---------------------------|-------------|------------|-------------------|
| dénaturation initiale | dénaturation              | Hybridation | élongation | Elongation finale |
| 95°C                  | 95°C                      | 55°C        | 72°C       | 72°C              |
| 2 mn                  | 30 sec                    | 30 sec      | 1 mn       | 7 mn              |

## **Electrophorèse**

### **Préparation d'un gel d'agarose 1%**

- Peser 1 g d'agarose en poudre dans un becher puis ajouter 100mL de tampon TAE 0.5x
- Faire bouillir le mélange dans un four micro-onde (environ 2 min)
- Laisser légèrement refroidir
- Ajouter 4µL de MidoriGreen
- Couler le gel dans une cuve puis positionner les peignes dans le gel
- Laisser le gel polymériser ½ heure à température ambiante
- Enlever délicatement les peignes
- Déposer le gel dans la cuve à électrophorèse

### Préparation des Amplicons

- Transférer 10µl de chaque produit d'amplification dans un microtube
- Ajouter 2µl de tampon de charge XC

|                     |       |
|---------------------|-------|
| Amplicon            | 10 µL |
| Tampon de charge XC | 2 µl  |

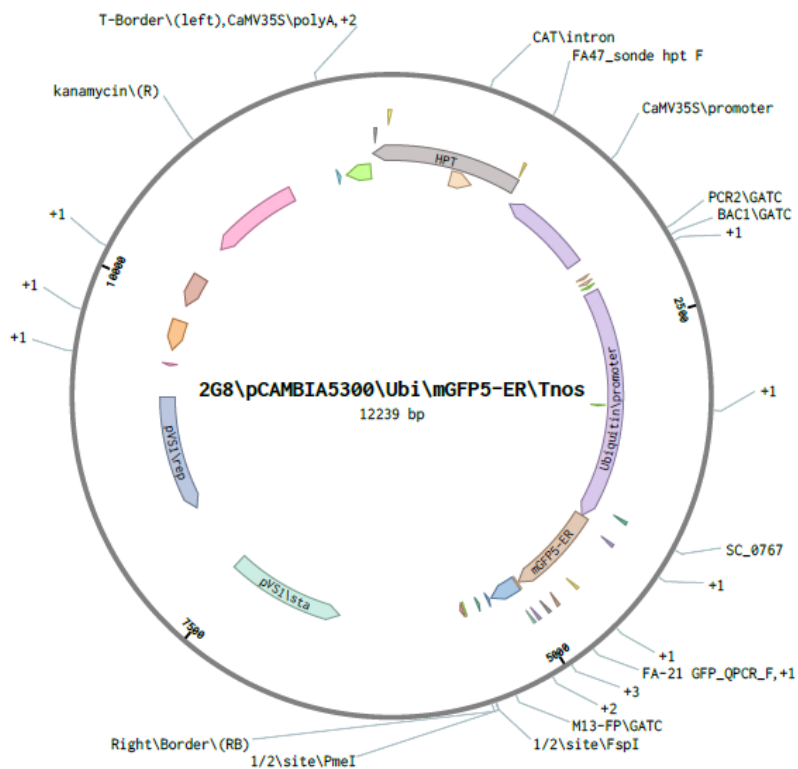
- Déposer les échantillons dans les puits du gel
- Réserver un puits pour le marqueur de taille : dépôt 5µL (ladder 1Kb+ Promega)

### Electrophorèse

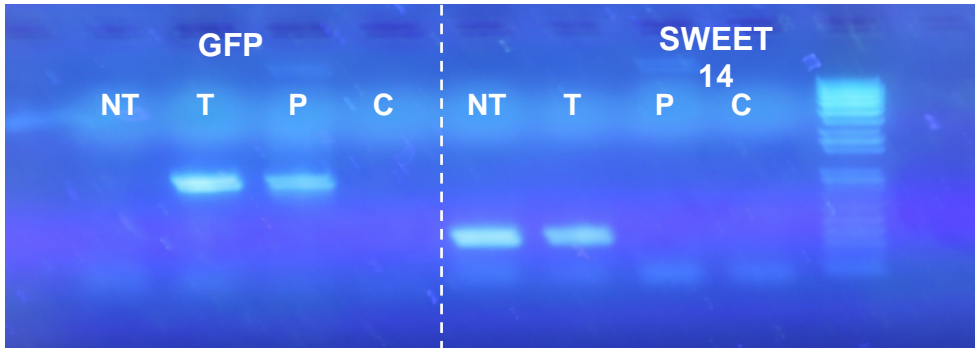
- Brancher le générateur et le régler à 100 V pour une durée de 25 mn
- Visualisation sous lampe UV (**Protection obligatoire**)
- Faire une photo du gel
- Interpréter les résultats

### Carte du vecteur

2G8\pCAMBIA5300\Ubi\mGFP5-ER\Tnos (12239 bp)



### Exemple de résultat :



Présence/absence des gènes GFP et SWEET14 dans différents échantillons révélé par PCR. GFP : green fluorescent protein (transgène), SWEET14 : un gène constitutif de la plante, NT : riz sauvage, T : riz transformé, P : ADN plasmidique, C : eau pure

## TP 6 : Etude de l'Expression du gène de l'alpha-amylase durant la germination du Riz et du gène de la RuBisCO chez le Tabac à l'aide de la technique RT-PCR

---

### Mots-clés

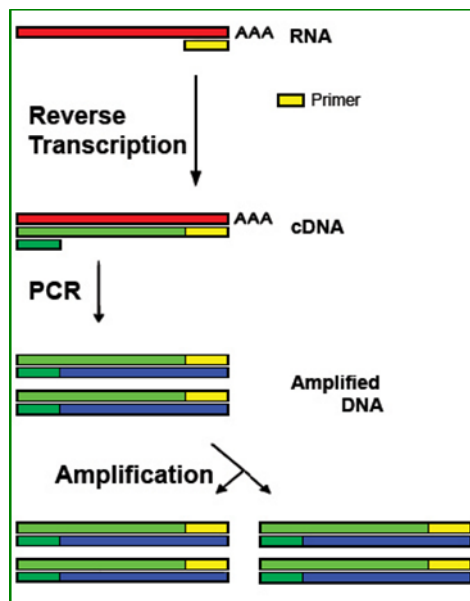
Plasticité génomique, PCR, ARNm, Transcription, Expression génique, PCR semi-quantitative

### Fondamentaux

La RT-PCR ou Reverse transcriptase PCR est une technique qui permet de détecter les ARN messagers. Cette technique est utilisée pour évaluer l'activité transcriptionnelle des gènes.

La RT-PCR est basée sur la propriété d'une enzyme virale, la reverse-transcriptase (RT) qui a la capacité de synthétiser une chaîne d'ADN à partir d'une matrice d'ARN.

La réaction de RT-PCR se déroule en deux étapes.



Dans une première étape, une amorce oligonucleotide polyT va reconnaître la queue polyA des ARN messagers. Cet amorçage va permettre à la RT de synthétiser, par complémentarité avec les bases de l'ARN, une molécule d'ADN simple brin. Les molécules d'ADN complémentaire (ADNc) qui en résultent ont l'avantage d'être beaucoup plus stables que les ARN plus délicats à manipuler.

Dans un second temps, des amorces dessinées d'après la séquence du gène d'intérêt vont permettre d'amplifier directement les ADNc précédemment obtenus par PCR standard.

Lorsque la quantité d'ARN de départ a été soigneusement dosée et que les performances de la réaction sont stables et répétables, la technique de RT-PCR est également utilisée pour quantifier un type d'ARN initialement présent dans un échantillon.

Plus un gène est exprimé et plus le nombre de molécules d'ARN augmente. Ainsi en évaluant le nombre de molécules d'ADNc correspondant, il est possible de comparer le niveau d'expression d'un gène d'intérêt dans différentes conditions, par comparaison avec un « gène de ménage » (*housekeeping gene*) dont l'expression est stable dans les conditions utilisées.

### Démarche pédagogique

Il s'agit de mettre en pratique la réaction de PCR pour quantifier l'abondance d'ARNm spécifiques d'un gène, afin de quantifier son expression dans des conditions bien déterminées.

Nous allons donc explorer le transcriptome de la plante, et ses changements en réponse à des changements d'environnement conduisant aux phénomènes de germination et de photosynthèse, pris comme exemple depuis le début de notre itinéraire pédagogique.

Nous allons étudier l'expression de différents gènes à partir d'ARNs extraits chez le riz et le tabac respectivement, en relation avec un ou plusieurs paramètre(s) pouvant affecter leur expression:

- Un gène du riz codant pour l'alpha-amylase, enzyme impliquée dans la germination des grains et plus généralement, dans l'utilisation des réserves carbonées de la plante. Cette expression va être étudiée en fonction de plusieurs paramètres susceptibles de faire varier l'expression de ces gènes :
  - nature du tissu : Grain (G) feuilles (F) ou racines (R)
  - stade de développement : 0, 2, 4 ou 12 jours après germination (G0, G2, G4, G12)
- Un gène de tabac codant pour l'enzyme-clé intervenant dans la fixation du CO<sub>2</sub> lors de la photosynthèse, la RuBisCO. Son expression va être étudiée chez des plantes sauvages (TW) et des mutants *albina* (TA), cultivés à la lumière (L) et à l'obscurité (O).

Une partie des expériences seront réalisées sur des ADNc obtenus par les apprenants eux-mêmes, à partir des ARNs fournis (ADNc "**Constantine**"). L'autre partie sera réalisée à partir d'ADNc préparés par les formateurs (ADNc "**Montpellier**").

### Première séance

- Electrophorèse des ARN totaux
- Préparation des ADNc (RT)

| Groupe | Plante | ARN         |
|--------|--------|-------------|
| 1      | Riz    | Racine, G2  |
| 2      | Riz    | Feuille, G4 |
| 3      | Riz    | G0, G2      |
| 4      | Tabac  | TWL, TAL    |
| 5      | Tabac  | TWO, TAO    |

### Deuxième séance :

- RT-PCR

| Groupe | Plante | Gène(s) étudié   | Conditions                              | Gène de contrôle |
|--------|--------|------------------|---|------------------|
| 1      | Riz    | alpha-amylases 1 | G2-G4-G12 / Racine                      | Actine1          |
| 2      | Riz    | alpha-amylases 1 | G2-G4-G12 / Feuille                     | Actine 1         |
| 3      | Riz    | alpha-amylases 1 | G0-G2-G4-G12                            | Actine 1         |
| 4      | Tabac  | RuBisCO          | Sauvage / Mutant<br>Lumière / Obscurité | EF1              |
| 5      | Tabac  | RuBisCO          | Sauvage / Mutant<br>Lumière / Obscurité | EF1              |

### Troisième séance :

- Electrophorèse des produits RT-PCR
- Analyse des résultats

## Matériel de départ

---

### Riz

Des graines de riz (variété IR64) ont été mises à germer en boîte de pétri sur du papier absorbant imbibé d'eau. Des prélèvements ont été réalisés après 0, 2, 4, 7 et 12 jours de germination. Les grains ont été séparés des feuilles (hypocotyle) et des racines. Seules les feuilles et les racines prélevées à 7 jours seront étudiées.

Les ARN totaux des feuilles et des racines ont été extraits à l'aide du kit RNAeasy Plant mini kit (Qiagen) suivant les recommandations du fournisseur. Un protocole adapté a été utilisé pour extraire les ARN totaux des grains de riz.

Les ARNs extraits ont subi un traitement à la DNase afin d'éliminer toutes traces résiduelles d'ADN.

## Tabac

Des plants de tabac sauvage et de mutant albina ont été cultivés *in vitro* à la lumière et à l'obscurité. Les ARN totaux ont été extraits à partir des feuilles à l'aide du kit RNAeasy Plant mini kit (Qiagen) selon la même méthode que celle utilisée sur les feuilles et les racines de riz.

## Gènes étudiés

| Nom du gène     | N° d'accession | Amorce      | Séquence des amorces            | Taille amplicon (pb) |
|-----------------|----------------|-------------|---------------------------------|----------------------|
| RuBisCO         | X02353.1       | Rbc1-S1     | CATGGTTGCACCTTTCACTG            | 246                  |
|                 |                | Rbc1-AS1    | GTCTCGAATTCCAAGCAAGG            |                      |
| EF1             | AF120093.1     | NTef1-S1    | CTCTCAGGCTCCCACTTCAG            | 164                  |
|                 |                | NTef1-AS1   | AAGAGCTTCGTGGTGCATCT            |                      |
| Alpha amylase 1 | Os02g0765600   | Amy1A-S1    | CTCCGAAGTGTGTCTGCAGCATGCAG<br>G | 161                  |
|                 |                | Amy1A-AS1   | CCATTCTCCTCCACGACTCCAGTT        |                      |
| Actine          | Os03g50885.1   | OsActine-S  | GCGTGGACAAAGTTTCAACCG           | 153                  |
|                 |                | OsActine-AS | TCTGGTACCCTCATCAGGCATC          |                      |

Les gènes actine et EF1 sont utilisés ici comme gènes de ménage afin de calibrer le niveau d'expression des gènes d'intérêt entre les échantillons comparés.

---

## Précautions à prendre pour la manipulation des ARNs



- Port de gants et de la blouse obligatoire
  - Espace de travail propre (si nécessaire nettoyer la paillasse avec une solution RNA-ZAP)
  - Matériel (cônes, tubes ...) et solutions (eau, tampons..) doivent être RNase-free
  - Utilisation d'embouts cotonnés pour tous les pipetages afin d'éviter les contaminations par des ADN et ARN indésirables
  - Travailler sur glace afin de limiter la dégradation des ARN et des enzymes
-



### **Electrophorèse des ARN totaux : 2 échantillons par groupe**

- Nettoyer la cuve électrophorèse et les accessoires avec une solution RNA-Zap
- Laisser sécher
- Préparer un gel d'agarose à 1% (tampon TAE 0.5X)
- Avant de couler l'agarose, ajouter 4µL pour 100mL de Midori green
- Laisser le gel polymériser ½ heure à température ambiante
- Décongeler sur glace les ARNs
- Préparation des échantillons d'ARNs

|                     |           |
|---------------------|-----------|
| ARN totaux          | 500 ng    |
| Eau RNase free      | qsp 10 µL |
| Tampon de charge XC | 2 µL      |

- Déposer les échantillons dans les puits, réserver un puits pour le marqueur de taille.
- Migration dans du tampon TAE 0.5X, 100V, 20 mn
- Visualisation sous lampe UV (Protection obligatoire)

### **Synthèse des ADNc (RT) : 2 échantillons par groupe**

#### **Kit ImProm-II reverse transcription System, PROMEGA, Ref A3800**

- Décongeler sur glace les solutions du kit
- Préparation des échantillons d'ARNs

|                |            |
|----------------|------------|
| ARN totaux     | 1 µg       |
| Eau RNase free | qsp 8.5 µL |
| Oligo(dT)15    | 1 µL       |
| Volume final   | 9.5 µl     |

Le volume d'ARN à utiliser se calcule en fonction des concentrations mesurées au Nanodrop pour les différents échantillons fournis:

- Dénaturation à 70°C pendant 5mn sur thermocycler
- Laisser sur glace 5 mn
- Réaliser un pulse à la centrifugeuse puis conserver sur glace
- Préparation du mix réactionnel RT

|                          |            |                       |
|--------------------------|------------|-----------------------|
|                          | 1 réaction | X n echantillon + 0.5 |
| MgCL <sub>2</sub> (25mM) | 4 µL       |                       |
| Tampon ImpromII 5X       | 4 µL       |                       |
| dNTP mix (10mM)          | 1 µL       |                       |
| RNasin (40U/µL)          | 0.5 µL     |                       |
| Improm-II RT             | 1 µL       |                       |
| Volume final             | 10.5 µL    |                       |

- Distribuer 10.5 µL du mix réactionnel par tube
- Reverse transcription sur thermocycler
  - Annealing : 5mn à 25°C
  - Extension : 1h30 à 42°C
  - Dénaturation : 15 mn à 70°C
- Pulse à la microfuge de 10 sec puis conserver les cDNA à -20°C

## 2<sup>ème</sup> SEANCE

---

### RT-PCR:

- La PCR sera réalisée en barrette de 0.2mL
- Dessiner le schéma réactionnel : nb de conditions (gène x échantillon)
- Réaliser un contrôle négatif (NTC = *no template control*, l'ADNc est remplacé par de l'eau) pour chaque gène étudié.
- Mix réactionnel pour une condition (1 puits)

|                             | RIZ     | TABAC   |
|-----------------------------|---------|---------|
| cDNA                        | 1 µL    | 0.5 µL  |
| Tampon 5X                   | 10 µL   | 10 µL   |
| dNTP mix (2.5 mM)           | 0.5 µL  | 0.5 µL  |
| Primer F (10 µM)            | 1µL     | 1µL     |
| Primer R (10 µM)            | 1µL     | 1µL     |
| GO TAQ G2                   | 0.2 µL  | 0.2 µL  |
| Eau RNase free (Vf : 50 µL) | 36,3 µL | 36,8 µL |

### Groupe 1

|          |         | RT Constantine |    | RT Montpellier |     | NTC |
|----------|---------|----------------|----|----------------|-----|-----|
| cDNA Riz |         | R              | G2 | G4             | G12 | eau |
| gènes    | Amy1    |                |    |                |     |     |
|          | Actine1 |                |    |                |     |     |

### Groupe 2

|          |         | RT Constantine | RT Montpellier | RT Constantine | RT Montpellier | NTC |
|----------|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----|
| cDNA Riz |         | F              | G2             | G4             | G12            | eau |
| gènes    | Amy1    |                |                |                |                |     |
|          | Actine1 |                |                |                |                |     |

### Groupe 3

|          |         | RT Constantine |    | RT Montpellier |     | NTC |
|----------|---------|----------------|----|----------------|-----|-----|
| cDNA Riz |         | G0             | G2 | G4             | G12 | eau |
| gènes    | Amy1    |                |    |                |     |     |
|          | Actine1 |                |    |                |     |     |

### Groupe 4

|            |         | RT Constantine |     | RT Montpellier |     | NTC |
|------------|---------|----------------|-----|----------------|-----|-----|
| cDNA Tabac |         | TWL            | TAL | TWO            | TAO | eau |
| gènes      | Rubisco |                |     |                |     |     |
|            | Ef1     |                |     |                |     |     |

### Groupe 5

|            |         | RT Montpellier |     | RT Constantine |     | NTC |
|------------|---------|----------------|-----|----------------|-----|-----|
| cDNA Tabac |         | TWL            | TAL | TWO            | TAO | eau |
| gènes      | Rubisco |                |     |                |     |     |
|            | Ef1     |                |     |                |     |     |

### Paramètres de l'amplification

|                       | Amplification : 28 cycles |             |            |                   |
|-----------------------|---------------------------|-------------|------------|-------------------|
| dénaturation initiale | dénaturation              | Hybridation | élongation | élongation finale |
| 94°C                  | 94°C                      | 55°C        | 72°C       | 72°C              |
| 5 mn                  | 30 sec                    | 30 sec      | 30 sec     | 7 mn              |

- Conserver les amplicons à -20°C

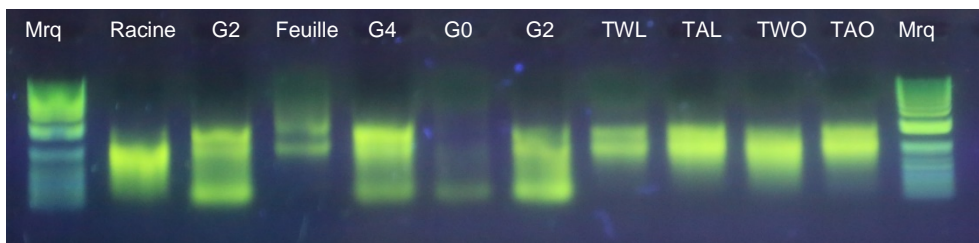
#### Electrophorèse des Amplicons RT-PCR:

- Préparer un gel d'agarose 2% (tampon TAE 0.5X),
- Avant de couler l'agarose, ajouter 4µL pour 100mL de Midori green
- Laisser le gel polymériser ½ heure à température ambiante
- Décongeler les Amplicons
- Préparation des Amplicons

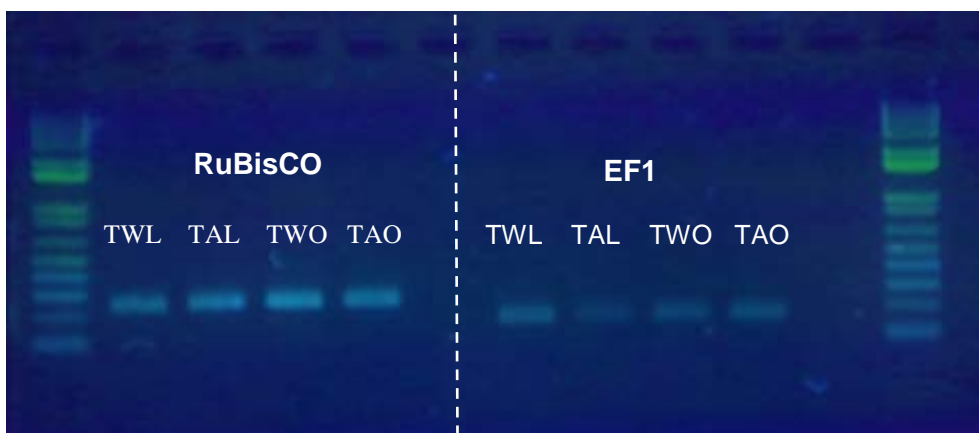
|                     |       |
|---------------------|-------|
| Amplicon            | 10 µL |
| Tampon de charge XC | 2 µl  |

- Déposer les échantillons dans les puits, réserver un puits pour le marqueur de taille.
- Migration dans du tampon TAE 0.5X, 100V, 30 mn
- Visualisation sous lampe UV (**Protection obligatoire**)

#### Analyse des résultats et discussion générale



Qualité des ARNs totaux extraits à partir de différents organes/tissus (Mrq : marqueur de taille, G0-G4 : graines de riz à différents stades de germination, TW : tabac sauvage, TA : tabac albina, les terminaisons L et O indique lumière et obscurité respectivement)



Profil d'accumulation du transcrite de la RuBisCO dans différentes conditions en comparaison avec le gène de ménage *EF1*, révélée par RT-PCR.